

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

**Validation der Verwendung von Rektalabstrichen mit
flüssigem Transportmedium zur Diagnostik der
Clostridioides difficile Infektion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Eva Kirpal
aus Aschaffenburg

promoviert am 21. Dezember 2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2021

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. N. Jazmati
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Th. Streichert

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Privatdozentin Dr. med. N. Jazmati von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Aschaffenburg, den 01. Juni 2021

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen einen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderen Dank gebührt Frau PD Dr. Nathalie Jazmati für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die entgegengebrachte Geduld und Ermutigung während des Studiums und der gesamten Arbeitsphase an dieser Dissertation danken.

Für meine Tochter Maria.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	9
2.1 <i>Clostridioides difficile</i>	10
2.2 Infektionsweg	10
2.3 Risikofaktoren	11
2.4 Therapie	11
2.5 Epidemiologie	13
2.6 Toxine als Virulenzfaktoren	13
2.7 Pathomechanismus	15
2.7.1. Pathomechanismus auf der Ebene des gesamten Organismus	15
2.7.2. Pathomechanismus auf der Ebene der Zelle	16
2.8 Diagnostik der CDI	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Studiendesign	20
3.2 Simulation des Rektalabstriches	21
3.3 <i>C. difficile</i> Echtzeit-PCR	23
3.4 Kombiniertes GDH und Toxin A/B Enzym Immunoassay Test	24
3.5 Toxigene Kultur	26
3.6 Identifikation mittels MALDI Biotyper	28
3.7 C. DIFFICILE TOX A/B II™-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
3.8 PCR Ribotypisierung	31
3.8.1. DNA-Extraktion	31
3.8.2. PCR	34
3.8.3. Sequenzierung/Ribotypisierung	36
3.8.4. Auswertung der Ribotypisierung	36
3.8.5. Materialien und Reagenzien Ribotypisierung	37
3.9 Statistische Analyse	38
4. Ergebnisse	39
4.1 Vergleich Nachweis von <i>C. difficile</i> mittels PCR in Stuhlproben und Rektalabstrichen (ZP1) 39	
4.2 Vergleich Nachweis von <i>C. difficile</i> mittels C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE (CDQCC) in Stuhlproben und in Rektalabstrichen (ZP1)	41

4.3	Vergleich Nachweis von <i>C. difficile</i> mittels toxigener Kultur (TK) in Stuhlproben und in Rektalabstrichen (FS) (ZP1)	43
4.4	Untersuchung des Einflusses der Lagerung von Rektalabstrichen bei -80°C auf den Nachweis von <i>C. difficile</i> mittels PCR, CDQCC und toxigener Kultur	45
4.5	Testcharakteristika in Stuhlproben und Rektalabstrichen	47
4.6	Ribotypisierung der <i>C. difficile</i> Isolate.....	48
5.	Diskussion	49
6.	Literaturverzeichnis	52
7.	Anhang (Curriculum Vitae/Approbationsurkunde).....	56
8.	Veröffentlichung der Studienergebnisse.....	58

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AGES	Health and Food Safety
CCFA	Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> -Infektion
CDT	<i>C. difficile</i> Transferase
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
FS	Fecal Swab
GI	Gastrointestinal
GLDH	Glutamatdehydrogenase
IDSA	Infectious Disease Society of America
LBM	Liquid-based microbiology
NAAT	Nukleinsäure-Amplifikationstest
NPV	Negativer Vorhersagewert
PaLoc	Pathogenitätslokus
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPV	Positiver Vorhersagewert
RA	Rektalabstrich
RA	Rektalabstrich
RT	Raumtemperatur
SHEA	Healthcare Epidemiology of America
TAT	„turn-around-time“ (Befundlaufzeit)
TK	Toxigene Kultur
ZP	Zeitpunkt

1. Zusammenfassung

Zur Diagnostik der *C. difficile* Infektion im mikrobiologischen Labor, werden in Deutschland flächendeckend Stuhlproben verwendet. Jedoch kann es unter Umständen schwierig sein, eine adäquate Stuhlprobe zu erhalten, denn manche Patienten können die Stuhlprobe nicht zur gewünschten Zeit abgeben oder der Patient kann überhaupt keinen Stuhl absetzen, im Falle eines Darmverschlusses. Zudem stellt das Sammeln einer Stuhlprobe eine gewisse Unannehmlichkeit für den Patienten, aber auch für das Krankenhauspersonal dar. Infolgedessen kommt es häufig zu Verspätungen bei der Abgabe einer Stuhlprobe [1, 2]. Für Studien ist der Gebrauch von Rektalabstrichen für das Sammeln, den Transport und zur Lagerung der Kotproben zur Diagnostik von *C. difficile* bereits üblich [3, 4]. Der Hauptgrund für die eingeschränkte Nutzung des Rektalabstriches in der Routinediagnostik ist, die sehr geringe Menge an Stuhl, die man mit einem Abstrich erhält. Mit dieser kleinen Menge ist es nicht möglich alle Tests im Labor durchzuführen, um eine CDI leitliniengerecht nachzuweisen. Seit der Einführung von Abstrichtupfersystemen mit flüssigem Transportmedium (Liquid-based microbiology [LBM]) besteht zumindest in der Theorie die Möglichkeit aus einem Abstrich mehrere Untersuchungen durchführen zu können. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, diese Art der Rektalabstriche mit flüssigem Transportmedium als Alternative zu Stuhlproben für den Nachweis von CDI im Labor zu evaluieren. Dazu wurde der Nachweis von *C. difficile* in 30 Stuhlproben mit dem Nachweis in je 30 Abstrichen mit flüssigem Transportmedium für vier verschiedene Labor-Analysen (PCR, GLDH und Toxin A/B Nachweis und Anlage einer toxischen Kultur) verglichen.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Lagerung der Abstriche bei -80°C für bis zu drei Monate auf die Testergebnisse untersucht. Bei Verwendung von Rektalabstrichen mit flüssigem Transportmedium war die Nachweisrate von *C. difficile* mittels PCR signifikant niedriger im Vergleich zur Nachweisrate aus Stuhlproben (25/30 [83.2%] vs 30/30 [100%]; $p = 0.019$). Eine Ursache könnte der Effekt der Verdünnung des Rektalabstriches in den 2 ml Transportmedium sein. Diese These lässt sich durch die signifikant höheren CT-Werte in den Rektalabstrichen stützen (Mittelwert $\text{CT}_{\text{Abstriche}}$, 28.4 ± 3.6 , versus Mittelwert CT_{Stuhl} , 25.2 ± 2.8 ; $p = 0.004$). Die Sensitivitäten für den Nachweis von *C. difficile* aus Rektalabstrichen mit Flüssigtransportmedium mittels PCR, toxischer Kultur, GDH Test und Toxin A/B ELISA war respektive 83.3%, 85.7%, 88% und 68.9%. Die Lagerung der Abstriche bei -80°C hatte keinen Einfluss auf die Nachweisrate.

Es kann aufgrund der Ergebnisse dieser Studie nicht empfohlen werden für die zweistufige Labordiagnose einer CDI Rektalabstriche mit Flüssigtransportmedium zu verwenden, da die Sensitivitäten (insbesondere für die Screeningtests PCR und GDH) zu niedrig sind.

2. Einleitung

Clostridioides difficile ist der wichtigste Erreger nosokomialer und Antibiotika-assoziiierter Diarröh [5-7]. Aber auch bei Patienten ohne Risikofaktoren und ohne Krankenhausaufenthalt kann *C. difficile* verantwortlich sein für Durchfallerkrankungen und assoziierte Komplikationen (ambulant erworbene *Clostridioides difficile*-Infektion [CDI]) [8, 9]. Die klinischen Manifestationen einer *C. difficile* Aufnahme des Menschen reichen von einer völlig asymptomatischen Besiedlung, über schwere Diarrhoen, bis hin zu dem lebensbedrohlichen Bild eines toxischen Megakolon mit Darmperforation, Sepsis und Tod. Das Auftreten von Rezidiven ist häufig (15% - 20%), geht mit einer enormen Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten einher und stellt eine besondere Herausforderung an die Therapie dar [10]. Infektionen mit *C. difficile* sind insbesondere assoziiert mit der Einnahme von Antibiotika, welche die natürliche Darmflora des Patienten stören und somit eine Ausbreitung von *C. difficile* im Darm begünstigen [11]. In den letzten zwei Dekaden sind Häufungen von CDI Fällen und eine erhöhte Morbidität der CDI-Verläufe zu verzeichnen [6, 7]. Für das Management, die Infektionskontrolle und die Therapie der Erkrankung ist eine schnelle und sichere Diagnose der CDI unerlässlich. Die mikrobiologische Diagnose der CDI erfolgt in Europa fast ausschließlich durch den Nachweis von *C. difficile* aus der Stuhlprobe, was den Richtlinien der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) entspricht [12].

Für Kontrollstudien zur Infektion und zur Überwachung (z.B. zur Erkennung von asymptomatischen *C. difficile* Trägern) ist der Gebrauch von Rektalabstrichen für das Sammeln, den Transport und zur Lagerung der Kotproben üblich [3, 4].

In Europa basiert entsprechend der Leitlinien der Nachweis von *C. difficile* im Labor aus klinischen Proben von symptomatischen Patienten auf einem zweistufigen Testsystem, welches aus einer Kombination von höchst sensitiven und höchst spezifischen Tests besteht. Zum Screening wird dabei zum einen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder ein Glutamatdehydrogenase (GLDH) Antigen Test verwendet. Zur Bestätigung eines positiven Screeningtests wird zusätzlich der Toxin A/B Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt, was den Richtlinien der ESCMID entspricht [12, 13]. Für ein solches Stufenschema wird eine gewisse Menge an Stuhl benötigt.

Bei der neuen Generation von Abstrichtupfersystemen mit flüssigem Transportmedium, wird das gesamte am Abstrich gesammelte Stuhlmaterial herausgelöst und in dem Transportmedium gelöst. Zudem wurde das Material an der Spitze des Abstriches verändert, was zu einer enormen Verbesserung der Regeneration und Lebensfähigkeit einiger Mikroorganismen geführt hat [14-17]. Dieses mit der Stuhlprobe angereicherte Medium kann dann in verschiedene Aliquots aufgeteilt werden. Dadurch liegen die Voraussetzungen für eine

zweistufige Labordiagnose der CDI aus Rektalabstrichen vor. Der Nachweis von *C. difficile* durch alle in den Leitlinien empfohlenen Tests (PCR, kombinierter GLDH und Toxin A/B ELISA, und Anlage einer toxigenen Kultur) von nur einem Abstrich mit flüssigem Transportmedium wurde bisher noch nicht systematisch untersucht und für den Nachweis von *C. difficile* sind zurzeit alle Untersuchungen validiert für ungeformte Stuhlproben [13].

2.1 Clostridioides difficile

Clostridioides difficile ist ein grampositives obligat anaerobes Bakterium, welches verantwortlich ist für milde bis hin zu lebensbedrohlichen Durchfallerkrankungen und Kolitiden. Es kommt in Stäbchenform vor und hat die Fähigkeit Sporen zu bilden, dadurch kann es auf Flächen extrem lange überleben. Es wurde erstmals im Jahr 1935 aus der gesunden Darmflora von Säuglingen isoliert und damals unter dem Namen *Bacillus difficilis* geführt, da das Bakterium schwer zu isolieren und zu kultivieren war [18]. Nach 1970 war eine detaillierte Charakterisierung des Bakteriums möglich und es erhielt den Namen *Clostridium difficile* [19, 20]). Im August 2016 wurde *Clostridium difficile* umbenannt in *Clostridioides difficile* [21].

C. difficile kann im Darmtrakt von Menschen und Tieren, sowie ubiquitär in der Umwelt z.B. im Boden oder in Flüssen und Seen, vorkommen. *C. difficile* findet sich bei bis zu 50% der Säuglinge im Darm [18].

Bei gesunden Erwachsenen findet sich *C. difficile* bei bis zu 5% der Personen im Darm. Nach Aufnahme in ein Krankenhaus kommt es relativ schnell zu einem Anstieg der Besiedlung auf über 20%. Dies manifestiert sich allerdings nur bei ca. 1,3% klinisch, der überwiegende Anteil der Patienten bleibt asymptomatisch [22]. Heute ist bekannt, dass *C. difficile* einer der häufigsten nosokomialen Erreger ist. Er verursacht ca. 15–20% der Antibiotika-assoziierten Diarrhöe und mehr als 95% der Fälle von pseudomembranöser Kolitis [23]. Von 100 antibiotisch behandelten Patienten rechnet man mit einer CDI. Die CDI kommt deutlich seltener außerhalb der Krankenhäuser vor, wobei die ambulant erworbene CDI in den letzten Jahren deutlich an Relevanz gewonnen hat und mittlerweile auch im ambulanten Sektor ein ernstzunehmendes Problem darstellt [24].

2.2 Infektionsweg

C. difficile kann von symptomatischen als auch von asymptomatischen Patienten an die Umwelt abgegeben werden. Wobei symptomatische Patienten deutlich größere Mengen von Bakterien und Sporen mit ihrem flüssigen Stuhl ausscheiden. Der Übertragungsweg ist dabei fäkal-oral. Gelangt das Bakterium als Zelle in die Umwelt überlebt es nur wenige Minuten

außerhalb des Organismus. Als Sporen dagegen, hat es eine extrem lange Überlebensfähigkeit auf Flächen, von bis zu fünf Monaten und kann direkt z.B. beim Kontakt mit dem Erkrankten oder den kontaminierten Händen des Pflegepersonals oder indirekt z.B. beim Kontakt mit kontaminierten Oberflächen der Umgebung des infizierten Patienten auf andere Personen übertragen werden. Die Sporen sind zudem resistent gegenüber den meisten Desinfektionsmitteln in Krankenhäusern und gegenüber vielen anderen Dekontaminationstechniken [25]. Aus diesem Grund müssen die hygienischen Maßnahmen in Patientenzimmern von *C. difficile* Trägern angepasst werden [25].

2.3 Risikofaktoren

40-60% der CDI sind assoziiert mit einer Antibiotikatherapie. Dies stellt das Hauptrisiko dar, an einer CDI zu erkranken [26, 27]. Zu unterscheiden sind hier Antibiotika mit hoher kolitogener Potenz, die sogenannten „4C“ Antibiotika (Clindamycin, Cephalosporine, Chinolone, Amoxicillin-Clavulansäure) und Antibiotika mit niedriger kolitogener Potenz, wie z.B. das Antibiotikum mit dem Wirkstoff Tetracyclin. Ein weiteres Risiko tragen Menschen älter als 65 Jahre, Hospitalisierung im Zeitraum der vergangenen drei Monate [27], Komorbiditäten und ein Aufenthalt im Alters- und Pflegeheim [28]. Ein erhöhtes Risiko an einer CDI zu erkranken besteht zudem bei der Einnahme von Präparaten mit Protonenpumpen-Inhibitoren [29], bei Patienten mit Immunsuppression und bei Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung [11, 30].

2.4 Therapie

Sobald eine CDI diagnostiziert wurde, ist eine sofortige angemessene Infektionskontrolle nötig, um das Ausbreiten des Keimes im Krankenhaus zu verhindern. Um die Richtlinien für eine Behandlung zu verbessern gibt es Behandlungsempfehlungen für bestimmte CDI Patientengruppen (anfängliche CDI: minderschwere Erkrankung; schwere CDI; erstes Rezidiv oder eine rezidivierende CDI; mehrfach rezidivierende CDI; Behandlung einer CDI, wenn die orale Gabe von Medikamenten nicht möglich ist) [12].

Die möglichen Behandlungsmethoden sind zum einen die Antibiotikatherapie und die Behandlung mit Resinen und Polymeren, die sich an die Toxine binden. Zum anderen die Immuntherapie, die Therapie mit probiotischen Medikamenten und die Stuhltransplantation [12].

Im Falle einer minderschweren CDI Erkrankung, die mit keinen Anzeichen einer schweren Kolitis einhergeht und klar entstanden ist aufgrund der Gabe eines Antibiotikums kann die

Therapie aus dem Absetzen des Antibiotikums bestehen, die die CDI Erkrankung hervorgerufen hat.

Die Standardantibiotika, um eine CDI zu behandeln waren bis vor Kurzem Metronidazol und Vancomycin. Metronidazol wird als orales Antibiotikum zur Behandlung einer anfänglichen CDI, die mild oder moderat verläuft empfohlen. Es wird gut vom Gastrointestinaltrakt aufgenommen und der Patient zeigt häufig eine schnelle klinische Besserung. Zudem ist es ein günstiges Medikament.

Vancomycin dagegen wird schlecht aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Somit ist aber die Konzentration des Medikamentes im Darm hoch, was sich positiv auf die Suppression des Bakteriums auswirkt und zu einem noch schnelleren Abklingen der Diarrhö führt. Ein weiteres Antibiotikum, dass zur Behandlung einer CDI eingesetzt wird ist Fidaxomicin. Fidaxomicin wird nur minimal aus dem Darm absorbiert, jedoch besteht bei diesem Medikament das Risiko eine Hypersensitivität zu entwickeln.

Da Vancomycin und Fidaxomicin, insbesondere bei der Verhinderung von Rezidiven, der Gabe von Metronidazol deutlich überlegen sind, wurde Metronidazol kürzlich aus den internationalen Empfehlungen zur Therapie der CDI gestrichen [31, 32].

Die Belege genügen nicht um die Gabe von Resinen/Polymeren und probiotischen Medikamenten zu unterstützen [12]. Jedoch gibt es in der Immuntherapie einen neuen Antikörper, der vor Rückfällen schützt. Bezlotoxumab nennt sich der humane Antikörper, der durch eine passive Immunisierung des Toxin B eine Rekurrenz einer CDI verhindert. Laut Lübbert et al. erleiden durchschnittlich 30% der Patienten nach einer Behandlung mit Metronidazol oder Vancomycin einen Rückfall [33]. Diese Rückfälle nehmen meist einen schwierigeren Verlauf und enden häufig tödlich. Durch die Kombination eines Antibiotikums und des Antikörpers Bezlotoxumab, ist ein abtöten der Bakterien sowie eine Inaktivierung des Toxins möglich. Der Antikörper leitet eine passive Immunisierung des Körpers gegen das Toxin B ein, das aus persistierenden *C. difficile* Sporen im Darm besteht [34].

Patienten mit einer fulminanten CDI, bei der die medikamentöse Therapie nicht anschlägt, mit einer Peritonitis, einem toxischen Megakolon oder einer Darmperforation müssen sich einer Kolektomie unterziehen.

Für mehrfach rezidivierende CDI Fälle, bei der der Patient auf kein Antibiotikum reagiert, wurde die Stuhltransplantation in Kombination mit der Gabe eines oralen Antibiotikums als Standard etabliert [12, 35].

2.5 Epidemiologie

Nach Lubbert sind etwa 3 bis 7% der gesunden Erwachsenen Träger von *C. difficile*. Bei Krankenhausaufenthalt steigt dieser Prozentsatz auf 16 bis 35 % an [11].

Die Letalität der CDI beträgt bei einer leichten Erkrankung 1 bis 2%. Jedoch steigt dieser Prozentsatz bei einer schweren Form auf 6 bis 30% an. In Europa werden die Kosten für das Gesundheitswesen durch CDI auf 3 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [36].

Weltweit erkranken immer mehr Menschen an einer CDI. In Deutschland ist ein Anstieg der besonders schweren Form der CDI zu verzeichnen, die Pseudomembranöse Kolitis mit toxischem Megakolon, Darmperforationen und Ileus. Zudem verbreitet sich der hochvirulente Epidemiestamm Ribotyp 027 immer weiter aus [11].

2.6 Toxine als Virulenzfaktoren

Die Pathogenität von *C. difficile* ist hauptsächlich auf zwei Exotoxine zurück zu führen: Toxin A, ein Enterotoxin und Toxin B, ein Zytotoxin. Diese beiden Toxine zerstören das Zytoskelett und die Tight Junctions von Targetzellen, was letztendlich zum Tod der Zelle führt [37, 38]. Das Bakterium an sich ist also nicht der Auslöser der Krankheit, sondern seine Toxine. Das Vorhandensein der Toxine ist maßgeblich an der Schwere des Verlaufs der Erkrankung beteiligt. Einige Stämme von *C. difficile* produzieren zusätzlich ein binäres Toxin, die sogenannte *C. difficile* Transferase (CDT) welche stark dem binären Toxin des Bakteriums *Clostridioides perfringens* ähnelt.

Die *C. difficile* Erregerstämme zeigen große genetische Vielfalt und können in eine Vielzahl von Toxin Typen unterteilt werden.

Die Toxine Toxin A und Toxin B werden durch die Gene *tcdA* und *tcdB* erzeugt, welche auf dem Pathogenitätsloкус (PaLoc) liegen. Der PaLoc ist eine DNA Sequenz auf der sich 3 weitere Gene befinden: Das erste Gen, *tcdD* ist wichtig für die *tcdA* und *tcdB* Genexpression. Das zweite Gen, *tcdE* wird benötigt, um die Toxine in den extrazellulären Raum zu entlassen. Das dritte Gen, *tcdC* ist zuständig für die negative Regulation [37].

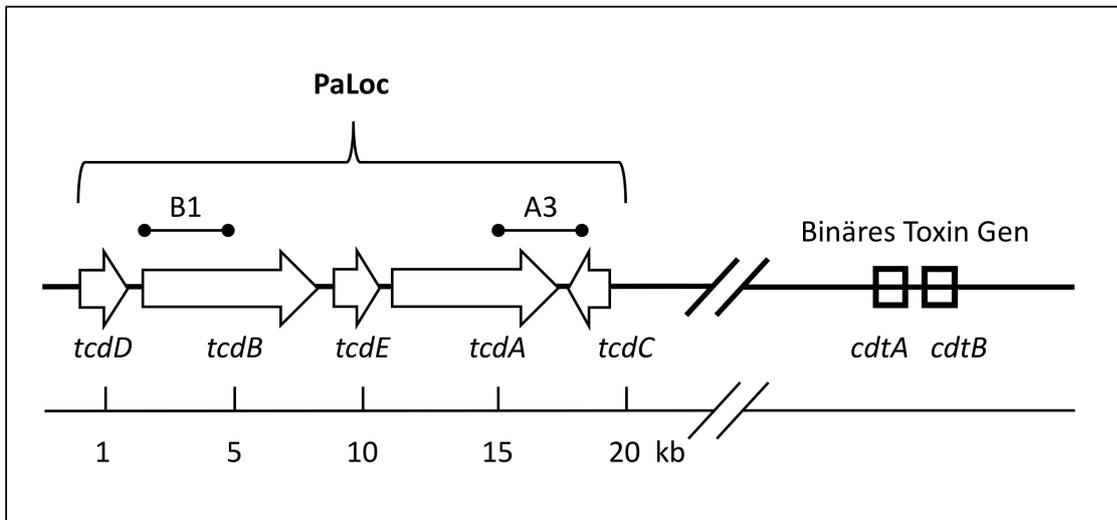


Abb.1: Die wesentlichen Gene auf dem Pathogenitätslocus (PaLoc) von *C. difficile* und ihre Verbindung zu den Genen des Binären Toxins. Quelle: [37].

Die Gene *tcdA* und *tcdB* kodieren jeweils die Toxine A und B, während *tcdD* den positiven Regulator für die Produktion der Toxine A und B kodiert. Das Gen *tcdE* kodiert ein Protein, was am Freisetzen der Toxine aus der Zelle beteiligt sein könnte. Das Gen *tcdC* ist der Negativregulator der Toxinproduktion. Die Gene *cdtA* und *cdtB* liegen nicht auf dem PaLoc. Sie kodieren Bestandteile für das binäre Toxin. B1 und A3 kennzeichnen die relative Größe und den Ort der Genfragmente nach der PCR für die Toxintypisierung [37].

Der PaLoc kann an nicht-pathogene Stämme übertragen werden und kann sich so vermehren. Er ist immer an der gleichen Stelle in allen toxigenen Stämmen von *C. difficile* zu finden. Die Expression von *tcdA* und *tcdB* ist von den äußeren Konditionen abhängig, wie zum Beispiel, das Vorhandensein spezieller Nährstoffe oder Temperaturschwankungen [39].

2.7 Pathomechanismus

2.7.1. Pathomechanismus auf der Ebene des gesamten Organismus

Der Pathomechanismus der nosokomial erworbenen CDI kann auf drei Ereignisse, welche in der Abbildung 2 beschrieben werden, zurückgeführt werden.

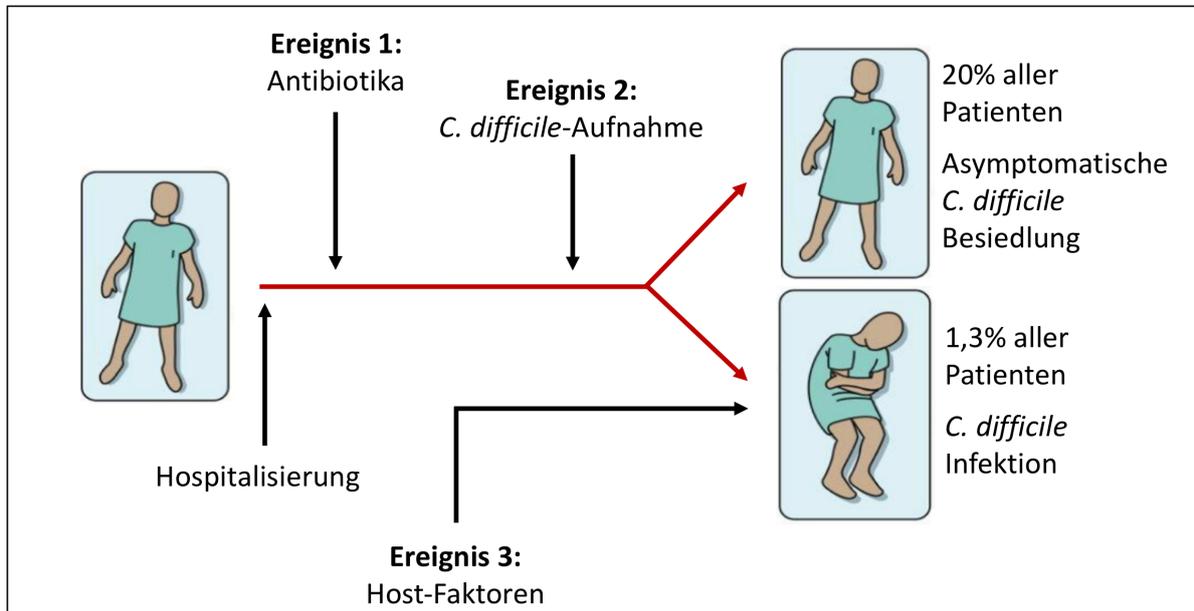


Abb.2: Pathomechanismus Model für die nosokomial erworbene CDI. Es sind mindestens drei Events wesentlich für die *C. difficile* Pathogenese. (Ereignis 1) Durch die Einnahme von Antibiotika wird der Patient infektionsanfällig. (Ereignis 2) Dadurch kann er nichttoxische (nicht-pathogene) oder toxische Stämme von *C. difficile* erwerben. Nach dem Erwerb toxigener Stämme kann eine asymptomatische Kolonisation oder eine CDI entstehen welches von einem oder mehrerer Events abhängig ist. (Ereignis 3) Darunter fällt unter anderem, die inadäquate Wirtsanamnestische IgG Antwort auf das *C. difficile* Toxin A (modifiziert nach Harrison – Innere Medizin, 19., überarbeitete Auflage [40])

2.7.2. Pathomechanismus auf der Ebene der Zelle

Die Toxinaufnahme in die Wirtszelle kann in sieben Schritte unterteilt werden, welche in der Abbildung 3 beschrieben werden.

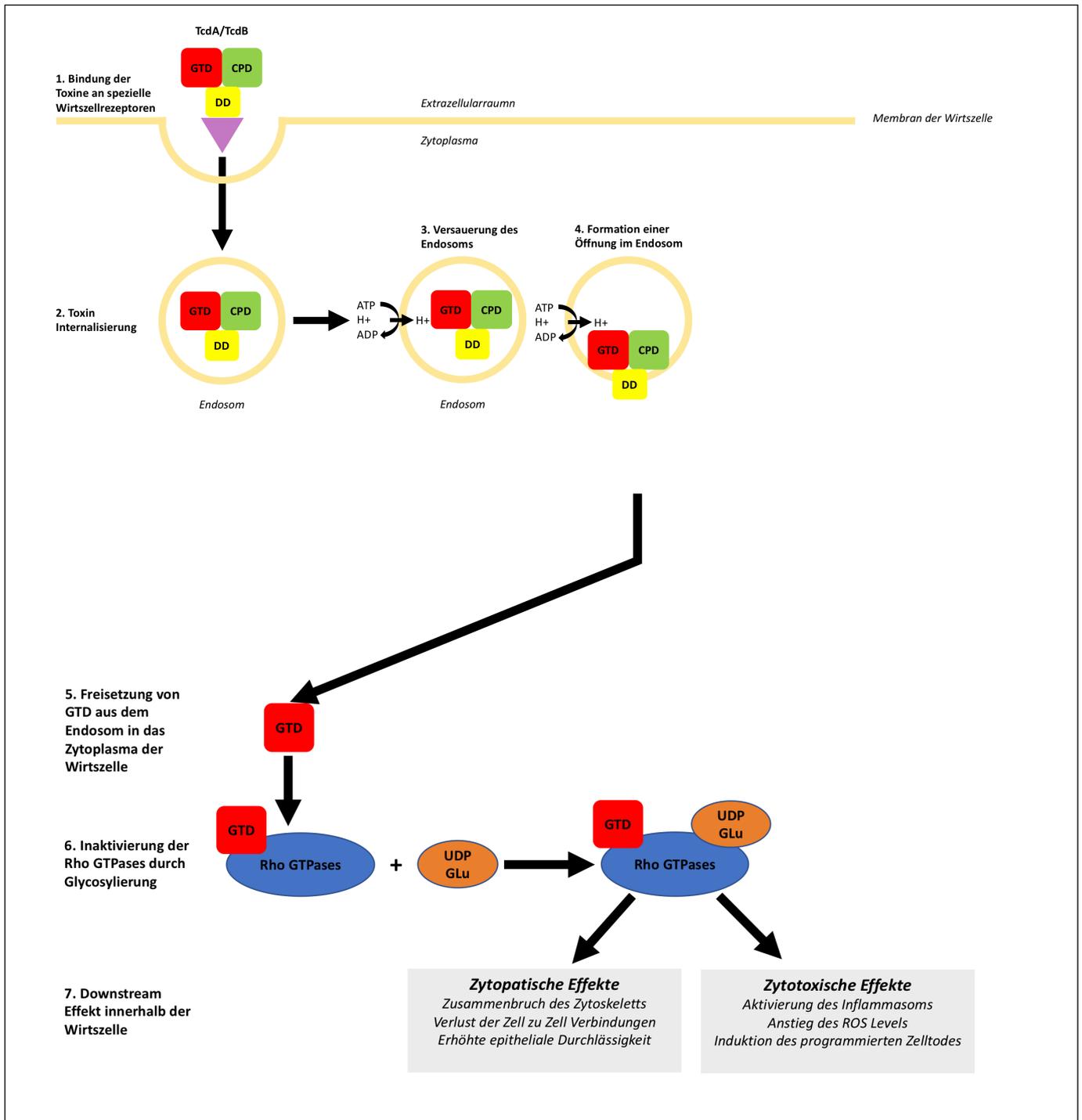


Abb.3.: Die sieben Schritte der Toxinaufnahme in die Wirtszelle: (1) Toxine binden an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle; (2) Toxine gelangen durch Endozytose in das Innere der Wirtszelle; (3) Azidifikation des Endosoms; (4) Endosom wird porös, (5) GTD gelangt aus dem Endosom in das Zytoplasma der Wirtszelle, (6) Rho GTPase wird inaktiviert; (7) der sogenannte „downstream effect“ tritt ein. Dieser Effekt führt zur

Zellschädigung wie unter anderem die Zerstörung des Zytoskeletts, Verlust der Zellkontakte durch Zerstörung der Tight Junctions, Aktivierung des Endzündungsprozesses oder letztendlich zum Zelltod. GTD: N-terminal glucosyltransferase domain (rot); CPD: cysteine protease domain (grün); DD: delivery domain (gelb) Quelle: Di Bella, Ascenzi et al. 2016 [39]

2.8 Diagnostik der CDI

Eine korrekte Diagnose der CDI ist wesentlich für die Behandlung der Patienten. Sie basiert auf einer Kombination von Symptomen und Signalen, mikrobiologisch gesichert durch den Nachweis von *C. difficile* im Stuhl der Patienten oder durch koloskopische und histopathologische Befunde, die eine pseudomembranöse Kolitis erkennen lassen [13].

Die richtige Diagnose einer CDI stellt eine wesentliche Anforderung im klinischen Alltag dar, denn es muss zuverlässig zwischen einer Infektion und einer Kolonisation unterschieden werden. Molekulare Tests (wie z.B. der Nukleinsäure-Amplifikationstest [NAAT] wie z.B. die PCR) welche nicht zwischen Kolonisation und Infektion unterscheiden sind die am meisten benutzten Tests, um eine CDI festzustellen. Durch das alleinige Benutzen eines NAATs, geht aber die Gefahr einer falschen Diagnose aus und Patienten, deren Darm lediglich mit *C. difficile* kolonisiert ist, können so falsch mit einer CDI diagnostiziert werden. Dies trifft speziell bei Patienten mit einem verringerten Risiko für eine CDI zu [31]. Folglich ist die Zielgruppe, welche auf eine CDI getestet werden sollten, Patienten, die ohne Grund und plötzlich mehr als drei Durchfälle innerhalb von 24 Stunden haben [41].

Im Jahr 2016 gab es eine Aktualisierung der Leitlinien der ESCMID mit neuen Empfehlungen zur Diagnostik von *Clostridioides difficile* [13]. In den Leitlinien wird von der Benutzung von einem alleinigen Test abgeraten, da der positive Vorhersagewert zu unsicher ist. Es wird ein 2-Stufen-Algorithmus empfohlen. Die Tests werden mit einem GLDH ELISA oder einem NAAT (PCR) begonnen. Patientenproben, die sich als negativ in diesem ersten Test herausstellen können auch als negativ befundet werden und die Probe muss keine weiteren Tests durchlaufen. Proben, bei denen das erste Testergebnis positiv ausfällt, müssten weiter mit einem Toxin A/B ELISA getestet werden. Um gleichzeitig auf GLDH und Toxin A/B zu testen steht zum Beispiel der C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE von Alere zur Verfügung.

Die internationalen Leitlinien zur Diagnose einer CDI gelten als Grundlage für den schnellen und evidenzbasierten Nachweis einer toxischen CDI aus ungeformten Stuhlproben. Empfohlen werden mehrstufige Diagnosealgorithmen - eine Kombination aus einem sensitiven Suchtest für das Bakterium *C. difficile* und einem Test der die toxische Infektion bestätigt (Tabelle 1).

Diagnoseverfahren	Indikation
Glutamat-Dehydrogenase (DGH) EIA (TAT 2 Stunden)	Initialer Suchtest mit hoher Sensitivität und hohem negativen prädiktiven Wert; GDH positive Proben müssen einen Bestätigungstest für die toxische Infektion unterlaufen.
Toxin-A- und -B-EIA (TAT 2 Stunden)	Bestätigungstest für die toxische Infektion bei GDH-positiven (2-Schritt-Algorithmus); Gute Korrelation mit schweren Infektionen bei nur eingeschränkter Sensitivität; Bei negativen Toxin-Nachweis wird eine NAAT empfohlen (3-Schritt-Algorithmus).
Zellkultur Zytotoxizitätstest, „cytotoxin neutralisation assay“ (CTNA) (TAT 24 Stunden)	Referenztest für den Nachweis von Toxinen im Stuhl; für die Routinediagnostik wird der CTNA aber aufgrund der längeren TAT und der geringeren Standardisierungs- und Automatisierbarkeit kaum eingesetzt.
NAAT der Toxin-Gene (TAT 4 Stunden)	Bestätigungstest für die toxische Infektion. Als Suchtest wird NAAT (z.B. PCR) nicht empfohlen, da auch vermehrt asymptomatische <i>C. -difficile</i> -Träger detektiert werden, die nicht behandelt und isoliert werden müssen.
Anaerobe toxische Kultur (TAT 72 Stunden)	Diagnostischer Goldstandard als Bestätigungstest für die toxische Infektion; Eingeschränkte Bedeutung für die Frühdiagnostik der CDI aufgrund der langen TAT; Die Kultur ist Voraussetzung für die Ribotypisierung und die Antibiotika-Resistenztestung bei kritisch kranken Patienten und bei Ausbrüchen.

Tab.1: Diagnostische mikrobiologische Untersuchungen auf *C. difficile* und ihre Wertigkeit nach Lübbert et al. [11]. TAT, „turn-around-time“ (Befundlaufzeit); EIA, Enzym-Immunoassay; NAAT, Nukleinsäure-Amplifikationstest (z.B. PCR)

Die Leitlinie gibt allerdings vor, keine asymptomatischen Patienten zu untersuchen und auf wiederholte Stuhluntersuchungen zu verzichten. Aufgrund der kurzen Befundlaufzeit, haben die Antigen-Schnelltests und die NAATs (Zweck des Nachweises des Genotyps des Bakteriums) besondere Bedeutung für die Routinediagnostik. Der Goldstandard der CDI Diagnostik ist allerdings die toxische Kultur. Hier wird eine anaerobe Kultur auf Spezialmedien gezüchtet und kontrolliert mit dem Nachweis der Toxine im Kulturbestand. Die toxische Kultur

ist Voraussetzung für weitere spezielle Untersuchungen, wie die Ribotypisierung und die Antibiotikaresistenztestung. Angesichts der langen Befundlaufzeit hat jedoch die Anlage einer Kultur wenig Bedeutung für die Akutdiagnostik (TAT > 72 Stunden) [11].

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die für diese Experimente verwendeten Stuhlproben, wurden an das Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität zu Köln, für eine routinemäßige CDI Testung, zwischen Juni und August 2016 gesendet. Die 30 verwendeten Stuhlproben wurden im Rahmen der Routinediagnostik mittels PCR gescreent (GeneXpert, Cepheid). Alle eingeschlossenen 30 Proben wurden in diesem Screening als *C. difficile* positiv getestet. Konnten die Stuhlproben, in der Routine nicht direkt nach Probeneingang getestet werden, wurden sie gekühlt gelagert und innerhalb von 24 Stunden getestet.

Diese 30 *C. difficile* positiven Stuhlproben wurden zur Simulation von Rektalabstrichen für diese Studie verwendet. Als Abstrichtupfersystem wurden COPAN FecalSwab™ (Copan Italia, Brescia, Italy) verwendet.

Je drei FecalSwabs (FS) wurden in jede der 30 unabhängigen *C. difficile* positive Stuhlproben von stationären Patienten des Universitätskrankenhauses in Köln getaucht, um einen Rektalabstrich zu simulieren. Alle Abstriche wurden von mir (Eva Kirpal) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, alle Abstriche gleich zu behandeln. Bei Herausziehen, aus der Stuhlprobe, wurde der Stuhl gleichmäßig an der Gefäßwand abgestrichen. Die FS wurden im Verlauf zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten getestet (zwischen den Testzeitpunkten wurden die Abstriche bei -80°C eingefroren gelagert) (vgl. Abb. 4 Studiendesign):

1. Testzeitpunkt: Der erste simulierte Rektalabstrich (FS1) wurde frisch, also sofort nach Entnahme getestet. Folgende Tests wurden aus dem Liquid Amies des FS durchgeführt: (1) GeneXpert *C. difficile* Test; (2) C. DIFF QUICK CHECK COMPLETE; (3) Toxigene Kultur. Danach wurde der Abstrich sofort eingefroren.
2. Testzeitpunkt: Der erste simulierte Rektalabstrich (FS1) wurde nach einem Monat erneut getestet. Die durchgeführten Tests entsprachen denen zu Testzeitpunkt 1.
3. Drei Monate nach Testzeitpunkt 1 wurde der zweite Rektalabstrich (FS2) getestet. Die durchgeführten Tests entsprachen denen zu Testzeitpunkt 1.

Der dritte Rektalabstrich FS3 wurde zur Sicherheit gesammelt.

Die Ergebnisse wurden untereinander und mit den Ergebnissen der Originalprobe verglichen. Somit konnte nicht nur untersucht werden, wie sich die *C. difficile* Test Algorithmen für ungeformte Stuhlproben im Vergleich zu Rektalabstrichen verhalten, sondern auch, ob das Einfrieren und Lagern der Proben einen Einfluss auf die Testergebnisse hat.

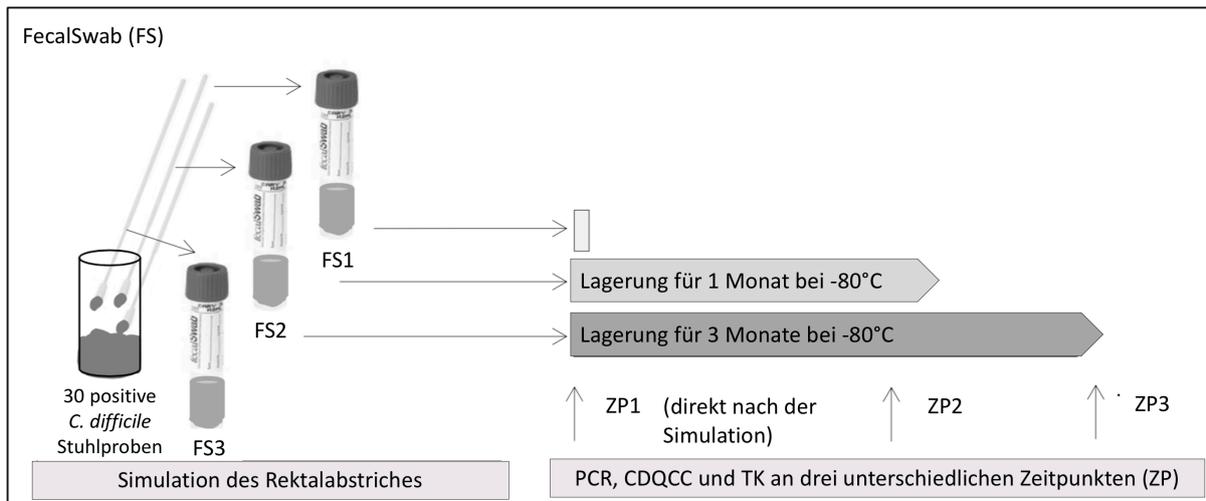


Abb.4: Studiendesign. Um einen Rektalabstrich mit dem FecalSwab (FS) zu simulieren wurden positive *C. difficile* Stuhlproben verwendet. Jeder der drei Abstriche beinhaltete die Flüssigkeit Cary Blair Medium und wurde vorsichtig in die Stuhlprobe eingetaucht. FS1 wurde sofort nach Simulation, auf *C. difficile* mittels, PCR, C. DIFF QUICK CHEK COMPLETE und mittels toxigener Kultur getestet (ZP1) und erneut nach einem Monat (ZP2). FS2 wurde nach drei Monaten (ZP3) Lagerung bei -80°C getestet. FS3 wurde zur Sicherheit simuliert und eingefroren.

3.2 Simulation des Rektalabstriches

Für die Simulation der Rektalabstriche wurde der beflockte, in einem flüssigen Transportmedium befindliche COPAN FecalSwabTM (Copan Italia, Brescia, Italy) (Abb. 5) benutzt. Der Abstrich ist ein Sammel-, Transport- und Aufbewahrungssystem für Kot und Rektalproben. Der FecalSwabTM enthält nach Herstellerangaben 2 ml Modified Cary Blair Medium. Aus dieser Flüssigkeit, in der die Stuhlprobe vom Abstrichtupfer mittels vortexen gelöst wurde, können alle drei Standardtests in der *C. difficile*-Diagnostik (PCR, GDH/Toxin A/B Elisa und Kultur) aus einem Abstrich durchgeführt werden.

Material:

- COPAN FecalSwabTM
- Vortex Genie 2TM
- Labortiefkühlschrank -80°C (Thermo-Fischer)

Durchführung:

Die Simulation der Rektalabstriche wurde mithilfe des COPAN FecalSwab™ im Labor durchgeführt. Jeweils drei Abstriche (zur Testung an drei verschiedenen Zeitpunkten) (n = 30) wurden aus CDI positiven Stuhlproben entnommen. Der Abstrichtupfer wurde dazu vorsichtig am Rand, des im Stuhlröhrchens befindlichen Stuhles, eingetaucht und bei Herausziehen am Rand abgestrichen, um eine vergleichbare Quantität an Stuhl zu sammeln, wie es bei einem am Patienten durchgeführten Rektalabstrich der Fall wäre. Nach dem „Abstrich“ wurde jeder Abstrichtupfer in das dazugehörige Röhrchen platziert. Um die Stuhlprobe vom Abstrich im Transportmedium zu lösen und zu verteilen wurde das Röhrchen für 10 Sekunden gevortext. Alle Abstriche wurden vom gleichen Untersucher vorgenommen. Damit die Menge an Stuhl an jedem Abstrich ähnlich ist, wurde darauf geachtet, dass jeder Abstrich auf dieselbe Art und Weise entnommen wurde. Die Abstriche wurden bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Abstriche wurden vor der Testung 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und der FS wurde für 30 Sekunden gevortext.



Abb.5: COPAN FecalSwab™ Quelle:

<https://products.copangroup.com/index.php/products/clinical/fecalswab>.

3.3 *C. difficile* Echtzeit-PCR

Der GeneXpert *C. difficile*/Epi Test (GX Test) (Cepheid, CA, USA) wurde benutzt, um *C. difficile* in klinischen Stuhlproben durch PCR nachzuweisen. Diese Echtzeit-PCR entdeckt das Toxin B Gen (*tcdB*), das binäre Toxin Gen (*cdt*) und eine Deletion am Nukleotid (nt) 117 im *tcdC* Gen, das auf den hypervirulenten *C. difficile* Ribotyp 027 hinweist. Die Tests wurden anhand der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Um die Menge von *C. difficile* in den Proben zu quantifizieren, wurden die cycle threshold (CT) Werte zur Detektion von *tcdB* dokumentiert. Niedrige CT Werte weisen auf eine große Anzahl von Targetgenen in der eingesetzten Probe hin.

Material:

- Diagnosesystemgerät GeneXpert® XVI
- GeneXpert Kartusche
- Pipette

Durchführung:

Zur Testung wurden Kartusche (Abb.6) und das Fläschchen mit der Elutionslösung beschriftet und das zu testende Abstrichröhrchen mit Liquid Amies wurde (nach Auftauen) für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden 400µl des liquid Amies aus dem Abstrichröhrchen in das Fläschchen mit der GeneXpert Elutionslösung pipettiert und erneut für 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurde der gesamte Inhalt aus dem Gefäß mit der Elutionslösung in die beschriftete Kartusche pipettiert. Am Laborcomputer wurde ein neuer Test erstellt und die Kartusche gescannt. Daraufhin erfolgte die Eingabe der Probennummer. Im nächsten Schritt wurde die Probe in das angezeigte Fach eingelegt und der Test gestartet. Die Ergebnisse konnten nach 45 Minuten abgelesen werden.



Abb.6: GeneXpert Kartusche und Fläschchen mit Elutionslösung

3.4 Kombiniertes GDH und Toxin A/B Enzym Immunoassay Test

Der Techlab® C. Diff Quick Chek Complete® Test (Alere, Cologne, Germany) [CDQCC]) ist ein ELISA, zum Nachweis von *C. difficile* und Toxin A und B. Mit diesem Test ist der Nachweis des *C. difficile*-Antigens Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Toxin A und B in einer Reaktion möglich. Als Prüfung für das Vorhandensein von *C. difficile* weist der Test das *C. difficile*-Antigen GLDH nach und bestätigt durch den Nachweis von Toxin A und B die Existenz von *C. difficile* Toxinen in der untersuchten Probe. Bei diesem Test werden spezifische *C. difficile*-Antikörper für GLDH und Toxin A und B eingesetzt. Auf der Testkarte befindet sich ein Reaktionsfenster mit drei vertikalen Linien aus unbeweglichen Antikörpern. Auf der linken Seite der Testkarte befindet sich die Antigentestlinie. Diese enthält Antikörper gegen *C. difficile* GLDH. In der Mitte der Karte liegt die gepunktete Kontrolllinie. Diese besteht aus Anti-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper. Die dritte Linie auf der rechten Seite ist die Toxin A- und B-Testlinie und enthält Antikörper gegen *C. difficile* Toxin A und B. Nach Herstellerangaben enthält das Konjugat Antikörper gegen GLDH und Antikörper gegen Toxin A und B, diese sind an die Meerrettich-Peroxidase gebunden (Abb.7).

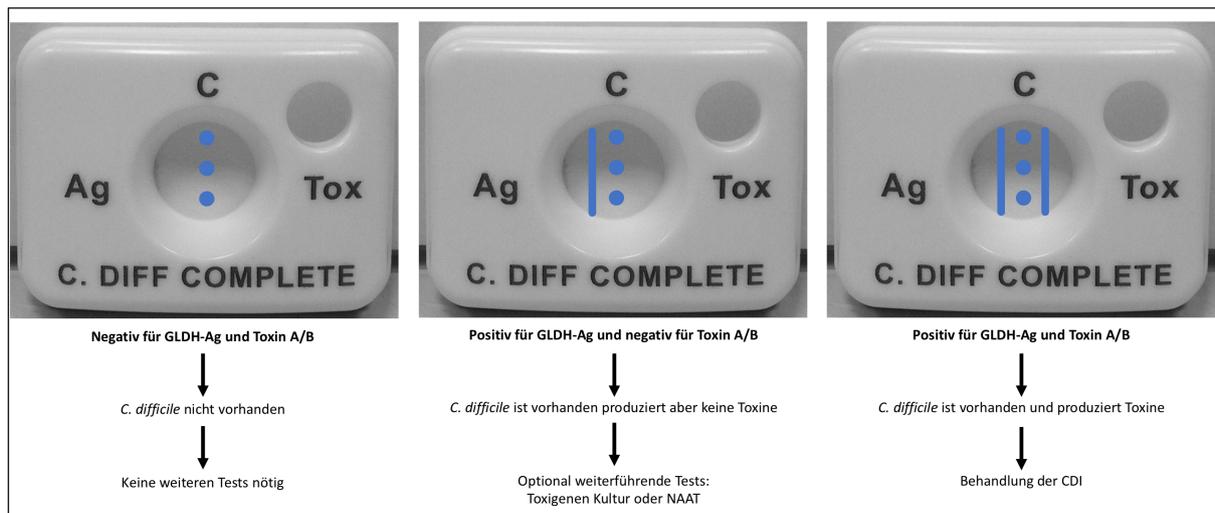


Abb.7: Der C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test. Darstellung der drei möglichen Testergebnisse im Reaktionsfenster und die daraus resultierende weitere Vorgehensweise. (Quelle: Hersteller Alere).

Material:

- Testkarten
- Verdünnungspuffer

- Waschpuffer
- Substrat
- Konjugat
- Positive Kontrolle
- Einweg-Kunststofftransferpipetten
- Timer

Durchführung:

Alle Reagenzien und Testkarten wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Zur Durchführung des Tests wurden, in ein Reagenzglas 650µl Verdünnungspuffer und ein Tropfen Konjugat pipettiert. Zunächst wurde das Probenmaterial, welches sich am Rektalabstrich befand, mithilfe eines Vortexers mit dem Transportmedium vermischt. Von diesem Gemisch, aus Probe und Transportmedium, wurden 100 µl in das Reagenzglas dazugegeben und erneut gevortext. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die verdünnte Proben-Konjugat-Mischung wurde anschließend in die Probenvertiefung pipettiert und die Testkarte bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Bei einer *C. difficile* positiven Probe bindet, während der Inkubation die vorhandene GLDH sowie Toxin A und B an die Antikörper-Peroxidase-Konjugation. Nachfolgend wurde das Reaktionsfenster mit 300µl Waschpuffer gespült und im Anschluss 2 Tropfen Substrat zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit ist das Ergebnis ablesbar. Erscheint weder auf der Antigen (Ag) Seite, noch auf der Toxin (Tox) Seite eine vertikale blaue Linie, ist der Test negativ, das bedeutet, *C. difficile* und dessen Toxine sind in dieser Probe nicht vorhanden. Erscheint nur auf der Ag Seite eine vertikale blaue Linie enthält diese Probe *C. difficile* Bakterien. Erscheint auf der Ag Seite und auf der Tox Seite eine vertikale blaue Linie, bedeutet dies, dass *C. difficile* Bakterien in dieser Probe vorhanden sind und diese Toxine produzieren. Eine gepunktete Linie in der Mitte des Reaktionsfensters muss bei allen Tests erscheinen, diese Linie stellt die Kontrolllinie dar, ohne diese ist der Test nicht auswertbar. Alle Auswertungen wurden nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

3.5 Toxigene Kultur

Um *C. difficile* zu isolieren wurde jede Probe auf einen selektiven und auf einen nicht selektiven Agar aufgebracht.

Für die nicht selektive Kultur, wurden die Proben nach „Alkohol-Behandlung“ auf Schaedler Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) Platten (Abb.8) mit 50µl der Flüssigkeit beimpft. Die Platten wurden bei 37°C anaerob inkubiert und nach 48 Stunden untersucht. Die Identifikation der *C. difficile* Bakterien auf einer Schaedler Agar Platte basiert auf dem charakteristischen Erscheinen der Kolonien. Die Morphologie der Kolonien erscheint sämig, gelb-grau-weißlich, mit einer irregulären, groben internen Struktur. Der Geruch entspricht dem für *C. difficile* bekannten Pferdestallgeruch.

Für die selektive Kultur wurde eine Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (CCFA; Oxoid Ltd., Thermo Fisher Scientific, Wesel, Germany) Platte (Abb.9) mit 50µl der Flüssigkeit beimpft. Die Platten wurden zusammen mit den Schaedler Agar Platten bei 37°C anaerob inkubiert und nach 48 Stunden untersucht. Die Morphologie der Kolonien, die sich auf dem CCFA Nährboden bilden, kann man als milchglasartig beschreiben. Die typische gelbe Verfärbung ist nicht nur innerhalb der Kolonien zu erkennen, sondern erstreckt sich auch rund um die Kolonien herum, was auf eine Toxin Produktion zurückzuführen sein könnte.



Abb.8: *C. difficile* wächst in einer Petrischale auf einem Schaedler Agar Nährboden. Die Kolonien der *C. difficile* Bakterien erscheinen grau bis weiß, opak, matt bis glänzend, flach, rund, und manchmal wurzelartig. Sie verhalten sich nicht hämolytisch und haben einen charakteristischen „Pferdemist“ Geruch.



Abb.9: *C. difficile* wächst in einer Petrischale auf einem CCFA Nährboden. Die Kolonien erscheinen milchglasartig und die, für dieses Nährmedium charakteristische gelbe Farbe der *C. difficile* Bakterien kommt zum Ausdruck. Zu beobachten ist die gelbliche Verfärbung nicht nur der Kolonien selbst, sondern auch um die Kolonien herum, was auf die Toxin Produktion zurück zu führen ist.

Material:

- Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar Platte
- Schaedler Agar Platte
- Alkohol 99,8% Ethanol
- Pipette
- Vortex Mischgerät
- Anoxomat
- Inkubator

Durchführung:

Beide Platten mit den Studiendaten wurden beschriftet. Die CCFA Platte wurde direkt mit 50µl des flüssigen Amies Mediums aus den Abstrichröhrchen beimpft.

Um die Schaedler Agar Platte zu beimpfen wurde vorher eine Alkohol-Behandlung der Probe zur Reduktion der Begleitflora durchgeführt. Dazu wurde in ein Röhrchen 50µl Alkohol (Alkohol 99,8% Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt) und 50µl der Probe gegeben und gevortext. Die Platte wurde mit 50µl des Gemisches beimpft. Zur Herstellung des anaeroben Milieus, zur Inkubation wurde ein Anoxomat benutzt. Die Platten wurden dazu in einen Anoxomatentopf platziert und ein Katalysator wurde eingebracht. Der Deckel wurde fest verschlossen und über

den Anoxomaten wurde dann die anaerobe Umgebung geschaffen. Danach wurden die Töpfe mit den Platten im Brutschrank bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Ein Wachstum auf den Platten mit *C. difficile* typischen Kulturen bedeutete eine weitere Identifizierung mit dem MALDI Biotyper und eine Isolierung des Stammes. Der Stamm wurde bei -80°C in einem Einfriermedium eingefroren.

3.6 Identifikation mittels MALDI Biotyper

Der MALDI Biotyper (Bruker Daltonics; Inc. MALDI Biotyper CA System; Billerica; USA) wurde für die Spezies-Identifikation von den Kolonien auf den Agarplatten verwendet. Dieses System ist ein diagnostischer in Vitro Massenspektrometer und dient der Identifikation von Bakterienkolonien mithilfe der matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie Technologie. Durch die Massenspektrometrie ist es möglich den einzigartigen molekularen Fingerabdruck eines Organismus zu messen. Der MALDI Biotyper misst die in allen Mikroorganismen enthaltenen Proteine. Durch die charakteristische und einheitliche Struktur der Proteine ist es möglich einen bestimmten Mikroorganismus exakt zu identifizieren. Dies geschieht durch den Vergleich der in den Proteinen enthaltenen Strukturen mit einer Datenbank [42].

Material:

- MALDI Biotyper CA System
- Matrix

Durchführung:

Abnahme einer isolierten Kolonie mit einem sterilen Holzstäbchen und Aufbringen des Materials auf gekennzeichnete Felder auf der MALDI Platte. Des Weiteren muss jedes Feld, das eine Probe enthält und ausgewertet werden soll, mit einer Matrix (100µl) benetzt werden. Diese muss vollständig vor der Messung getrocknet sein. Es wurde für jedes Isolat Doppelmessungen durchgeführt. Danach wurde eine neue MALDI-TOF Projekt Liste angelegt. Die Software generiert automatisch das Spektrum, der auf der MALDI Platte befindlichen Bakterien und Pilze und vergleicht diese mit der in der Software gespeicherten Mikroorganismen. Durch die nächstgelegene Übereinstimmung des Spektrums kann eine Identifikation stattfinden und überprüft werden. Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.7 C. DIFFICILE TOX A/B II™-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Toxine A und B in den angezüchteten *C. difficile* Isolaten nachzuweisen wurde ein ELISA-Schnelltest durchgeführt. Der C. DIFFICILE TOX A/B II™ (C. DIFFICILE TOX A/B II™; TechLab; Emergo Europe, Den Haag, Netherlands) ist ein ELISA zum Nachweis von *C. difficile* Toxin A/B in Stuhlproben. Die Mikroassay-Behälter, die im Laborsatz enthalten sind, beinhalten bewegungsunfähige, affinitätsgereinigte, polyklonale Antikörper der Ziege, gegen das Toxin A und B. Der Antikörper, der zur Erkennung von *C. difficile* genutzt wird, besteht aus einer Mischung aus Toxin A monoklonalem Maus Antikörpern verdünnt mit Meerrettich Peroxidase und Toxin B polyklonalem Ziegen Antikörpern verdünnt mit Meerrettich Peroxidase. In der Untersuchung wird ein Teil der Probe im Verdünnungsmittel emulgiert. Die emulgierte Probe wird dann in die Mikroassay-Behälter, in denen sich die Antikörper befinden, pipetiert. Falls nun das Toxin A und B in der Probe enthalten ist werden diese in der Inkubationsphase an die Antikörper und die bewegungsunfähigen, affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper gebunden. Jedes Material, das sich nicht bindet, wird während der einzelnen Waschschriffe entfernt. Des Weiteren wird ein Substrat pipetiert, dass aufgrund des Enzym-Antikörper-Antigen Komplexes, seine Farbe für *C. difficile* positive Proben ändert.

Material:

- Material im Kit enthalten:
 - Diluent
 - Konjugat
 - Substrat
 - Positive Kontrolle
 - Waschpuffer Konzentrat
 - Stop Lösung
 - Mikroassay Platte
- Zusätzlich benötigtes Material:
 - Zeitmesser
 - Vortex Mischgerät
 - Destilliertes Wasser
 - Spectrophotometer
 - Kühlschrank
 - Inkubator
 - Dynex MRX TC Revelation Microplate Reader

Durchführung:

Entnahme von 4-5 Kolonien von der zu testenden Platte und zusammen mit 200µl Diluent in ein Eppendorf Röhrchen geben. Alles 10 Sekunden vortexen. Danach bei 5000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugieren. In jeden Well wird ein Tropfen (50 µL) Konjugat pipettiert. In die Behälter zur positiven und negativen Kontrolle werden 50µL der jeweiligen Kontrolle gegeben. Danach werden 100 µL der Probe aus dem Röhrchen in die jeweiligen Wells pipettiert und bei $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ für 50 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Behälter ausgeschüttet und mit der Wasch Lösung ausgewaschen. Die umgedrehte Platte wird dann auf einem sauberen Papiertuch ausgeschlagen. Die Waschung wird fünf Mal wiederholt und die Platte wird dazu immer wieder auf einem Papiertuch ausgeschlagen. Falls danach immer noch Partikel in den Behältern sichtbar sind, wird die Waschung so lange wiederholt, bis die Partikel ausgespült sind. Nachdem keine Partikel mehr in den Behältern sind, wird die restliche Flüssigkeit, durch erneutes Ausschlagen auf ein sauberes Papiertuch entfernt. Danach werden 2 Tropfen (100 µL) des Substrates in jeden Behälter pipettiert, durch leichtes Klopfen gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei 5 Minuten wird nochmals der Behälter leicht geklopft. Des Weiteren werden 1 Tropfen (50 µL) der Stop-Lösung in jeden Behälter gegeben und wieder geklopft. Nach zwei Minuten kann das Ergebnis abgelesen werden. Durch die Stop-Lösung verändert sich die Farbe in den Behältern von Blau zu Gelb. Die positive Kontrolle erscheint deutlich sichtbar als gelbe Lösung und die negative Kontrolle deutlich sichtbar als klare Lösung. Dadurch kann die optische Dichte ab 450 nm auf einem ELISA Lesegerät (Dynex MRX TC Revelation Microplate Reader) ermittelt werden. Die Ergebnisse des Tests lassen sich auch visuell in gutem Licht und auf einem hellen Hintergrund ablesen (Abb.10). Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben.



Abb.10: C. DIFFICILE TOX A/B II™ - ELISA. Die Mikroassay-Platte auf der sich fünf Wells befinden. Die gelblich gefärbten Lösungen in den Wells sind positiv auf Toxin A/B und die klaren Lösungen sind negativ, ohne Toxine. Die unterschiedliche Intensität der gelb gefärbten Lösungen in den Wells deutet auf die Menge des Toxin A/B hin.

3.8 PCR Ribotypisierung

Durch kapillare Gel-basierte PCR Ribotypisierung wurden alle in der Studie kultivierten *C. difficile* Isolate weiter charakterisiert. Durch die Ribotypisierung wird ein genetischer Fingerabdruck von ribosomaler DNA mittels Restriktionsfragmentlängenmorphismus erzeugt. Untersucht wurde die extrahierte genomische DNA von den im Rahmen der Studie kultivierten *C. difficile* Isolaten.

Die PCR-Ribotypisierung besteht aus 4 Arbeitsschritten (DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung, Auswertung der Ribotypisierung), die im Folgenden beschrieben werden.

3.8.1. DNA-Extraktion

Bis zur Bearbeitung waren die Proben bei -80°C eingefroren. Die *C. difficile* Stämme wurden aufgetaut und mit einer blauen Öse zur Anzucht auf den Anaerobier-Agar okuliert. Danach wurden die Agar-Platten für 48h bei $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in anaerober Atmosphäre bebrütet. Somit erhielt man eine frische Subkultur des zu testenden *C. difficile*-Isolates, die maximal 48 h alt war. Vor der DNA-Extraktion wurde das Isolat erneut mittels MALDI-TOF identifiziert. Von der so bestätigten *C. difficile* Kultur ausgehend, erfolgte die DNA-Extraktion mit dem QIAamp Mini Kit. Erweitert, um eine mechanische Lyse mit Glasbeats (Protokoll siehe unten). Das QIAamp DNA Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden,

Deutschland) ermöglicht eine DNA Isolierung aus dem Probenmaterial. Das QIAamp DNA Mini Kit nutzt die Eigenschaften der selektiven Bindung an einer Siliziummembran, um die reine DNA zu erhalten. Die Zellen der Proben werden in einer optimierten Buffer Lösung aufgelöst und die DNA Bindung wird angepasst. Danach werden die Proben direkt in die QIAamp Spin Ständer eingelegt. Die DNA bindet an die Siliziummembran und Rückstände werden durch zwei Waschungen vollständig entfernt.

Die extrahierte DNA wurde am Nano-Drop gemessen und für die folgende PCR auf 0,1 bis 1 ng/µL mit Aqua dest. verdünnt.

DNA-Extraktion-Protokoll

Vorbereitung:

1. Proben auf Raumtemperatur bringen (15-25 °C)
2. Zwei Schüttler vorheizen: 56°C (für Schritt 2) und 70°C (für Schritt 3)
3. AE Puffer oder destilliertes Wasser auf Raumtemperatur bringen
4. Puffer AW1 und AW2 müssen laut Anweisung zubereitet worden sein
5. Wenn sich Ausfällungen im Puffer ATL oder Puffer AL gebildet haben:
Bei 56°C inkubieren

Durchführung:

1. 200 µl ATL- Puffer in das Gefäß mit den Glasbeats pipettieren—> darin 2x blaue Ösen, halb mit Probenmaterial bedeckt, einrühren
2. 3 x 15 sek. Glasbeats schütteln lassen (Precellys 24), alternativ Speedmill „Bakterien“-Programm laufen lassen.
 - 2a. Schaum herunter zentrifugieren (1 Minute, 13000 rpm)
 - 2b. Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettieren
3. 20 µl Proteinase K zufügen—> vortexen
4. bei 56 °C, auf Schüttler, inkubieren (Zeit: 10 min.)
5. kurz, bei 8000 rpm, zentrifugieren
6. 200 µl AL Puffer zufügen
7. 15 sek. vortexen

8. für 10 Minuten, bei 70 °C, inkubieren
9. kurz, bei 8000 rpm, zentrifugieren
10. 200 µl Ethanol zufügen
11. 15 Sekunden vortexen
12. kurz, bei 8000 rpm, zentrifugieren
13. Mixtur in QIAamp Spin Column, welches in 2 ml collection tube steht, füllen
14. 1 Minute, bei 8000 rpm, zentrifugieren
15. QIAamp Spin Column in sauberes "Collection Tube" umlagern
16. Röhrchen mit der Flüssigkeit entsorgen
17. 500 µl Puffer AW1 hinzufügen (Rand nicht befeuchten!)
18. für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
19. QIAamp Spin Column in sauberes 2 ml "Collection Tube" umlagern
20. Röhrchen mit Flüssigkeit entsorgen
21. 500 µl Puffer AW2 hinzufügen (Rand nicht befeuchten!)
22. für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren
23. Röhrchen erneut tauschen und erneut zentrifugieren (1 Minute, 14000 rpm)
24. QIAamp Spin Column in 1,5 ml Eppendorfgefäß stecken
25. Spin Column öffnen
26. 50 µl Puffer AE (oder Aqua dest.) hinzufügen
27. 5 Minuten, bei Raumtemperatur, inkubieren
28. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
29. Schritte 25-28 wiederholen
30. Spin Column verwerfen und Eppendorfgefäß verschließen
31. DNA-Gehalt bestimmen mittels Nanodrop
32. Eppendorfgefäß einfrieren

Die extrahierte DNA wurde am Nano-Drop gemessen und für die folgende PCR auf 0,1 bis 1 ng/µL mit Aqua dest. Verdünnt und bei -80°C eingefroren.

Messung des DNA-Gehalts mittels Nanodrop 2000:

Mit Hilfe des Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, US) ist es möglich die Konzentration von aufgereinigten DNA Proben, die bei 260 nm absorbieren, zu messen.

Messung des DNA-Gehalts in den extrahierten Proben:

Als ersten Schritt, wählt man auf der Startseite die Registerkarte „Nukleinsäuren“ aus und tippt abhängig von den zu messenden Proben auf „dsDNA“, „ssDNA“ oder „RNA“. Als nächstes werden 1 bis 2 µl Leerlösung auf den unteren Teil des Messplatzes pipetiert und der Gerätearm wird abgesenkt. Dann auf Leerprobe drücken und warten bis die Messung beendet ist. Nach der Messung wird der Gerätearm aufgestellt und die Messplätze mit einem neuen Labortuch gereinigt. Nach der Reinigung werden 1 bis 2 µl Probenlösung auf den Messplatz pipetiert und der Gerätearm wird wieder abgesenkt. Danach wird die Probenmessung gestartet. Nach Beendigung der Probenmessung wird das Spektrum und die ausgewiesenen Werte angezeigt. Nun auf „Versuch beenden“ klicken und erneut den Gerätearm aufstellen und beide Messplätze mit einem neuen Labortuch reinigen. Die Auswertung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.8.2. PCR

Die verdünnte DNA wurde zur Amplifizierung der 16S-23S-Region von *C. difficile* eingesetzt (Protokoll nach Fawly et al.[43]). Dazu wurden die folgenden FAM-gelabelten Primer verwendet [43]:

- 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3' (16S) - 5' markiert mit 6-Carboxylfluorescein (6-FAM)
- 5'-CCCTGCACCCTT-AATAACTTGACC-3' (23S) - 5' markiert mit 6-Carboxylfluorescein (6-FAM)

Für den PCR Ansatz wurde das folgende Schema verwendet:

PCR Ansatz	1x Reaktion
10x PCR-Buffer	2,5 µL
Q-Buffer	5,0 µL
Primer 16S (10µm)	0,5 µL

Primer 23S (10µM)	0,5 µL
MgCl₂	0,5 µL
dNTPs	0,5 µL
HotStarTaq Polymerase	0,15 µL
H₂O	13,35 µL
Template DNA (1-10 ng/µL)	2,0 µL

Das PCR-Programm „Cdiff RIBOTYPING“ mit 24 Zyklen wurde am Thermocycler im PCR Labor durchgeführt:

Phase	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95 °C	15 min
Denaturierung }	95 °C	1 min
Annealing } 24 Zyklen	57 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min
Finale Elongation	72 °C	30 min
Ende	4 °C	∞

Bis zur Ribotypisierung wurden die PCR Produkte bei -80°C eingefroren.

3.8.3. Sequenzierung/Ribotypisierung

Für die Ribotypisierung wurde ein Ansatz aus je 0,5 µL LIZ Standard 12000 und 8,5 µL HiDi Formamide vorbereitet, gut resuspendiert und in einer 96er Well-Platte vorgelegt. Die PCR-Produkte wurden je 1:10 und 1:50 mit dest. Wasser verdünnt und in die 96er Well-Platte dazu pipettiert. Es wurden immer Doppelbestimmungen angelegt. Dies bedeutete, pro Probe wurden insgesamt 4 Testungen durchgeführt. Die Positionen der Proben wurden in das dafür vorgesehene Excel-Sheet (96-Vorlage_1_SampleSheet_1200bp_G5) eingetragen. Die Proben wurden unter der vorgesehenen 8 stelligen Studiennummer getestet. Die Platte wurde mit einem Plastiksealer verschlossen und mit QUIKSTAT an die Microsynth AG in Lindau versendet. Die Barcodenummer der Platte und die Plattenbelegung wurde auf der Sample-Sheet-Liste notiert und per E-Mail versendet. Die Ribotypisierung erfolgte unter den Parametern, die im Protokoll von Fawlwy et al. vorgegeben waren [43].

3.8.4. Auswertung der Ribotypisierung

Die Interpretation der Ribotypisierung (Fragmentanalyse) erfolgte nach Indra et. al. mit WebRibo [44].

WebRibo ist eine Open-Source-Software, die von der Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES) angeboten wird. Die gewonnen kapillarisch-sequenzbasierten PCR Ribotypisierungsdaten wurden automatisch durch die Software analysiert und mit den Werten anderer Labors verglichen. Die Software gibt an, um welchen Ribotyp es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Probe handelt. Die Bestimmung der Ribotypen erfolgte über Fragmentanalyse wie folgt:

1. Immer 10 fsa.-files wurden zunächst in einen Ordner gezippt.
2. Bei Webribo einloggen und auf Upload klicken. Bei Data file* auf Durchsuchen klicken und den ZIP-Ordner auswählen. Dann auf hochladen „upload“ klicken.
3. Die hochgeladenen Isolate sind unter „results“ aufgelistet.
4. Quality Check: Das Programm unterscheidet Rot=Fehler und grün=Daten ausgewertet. Um die Qualität der Daten sicher zu stellen, müssen die Rohdaten jeden Isolates geprüft werden. Dazu im Isolat auf „Raw data“ klicken und in der oberen Leiste dann auf „summary“. Jetzt wird eine Grafik mit den verschiedenen Peaks und darunter eine Tabelle mit den Längen und Höhen der Peaks angegeben.

Grundsätzlich gelten nun folgende Grundsätze:

- Gibt es zwei Peaks, die weniger als 1.5 Basenpaare auseinander liegen, wird der erste nicht gewertet.
- Alle Signale, die <10% des höchsten Peaks sind, werden nicht gewertet.
- Die Peak-Länge muss zwischen 200 und 620 Basenpaaren liegen (alles darüber und darunter wird nicht gewertet).
- Der höchste Peak sollte zwischen 1200 und 5500 liegen. Da alle Daten in Doppelansätzen und in verschiedenen Konzentrationen vorliegen sollten, sollte die Frequenz mit der besten Datenqualität ausgewertet werden.

Mit Hilfe dieser Kriterien, wurde jede Ribotypisierung analysiert und ein Ribotyp festgelegt. Datensätze, die wegen mangelnder Qualität nicht ausgewertet werden konnten oder einen neuen Ribotyp ergaben, der nicht in der Datenbank hinterlegt war, wurden neu angesetzt und wiederholt.

3.8.5. Materialien und Reagenzien Ribotypisierung

Kulturmedien und Reagenzien:

- Brucella-Blut-Agar (+ Haemin und Vitamin K) (BD) zur Anzucht von Anaerobiern
- Indikatorstreifen für Anaerobiertöpfe
- Matrix zur Kristallisation der Erregersuspension auf dem Target für die Massenspektrometrie
- DNA-Extraktions-Kit (QIAamp DNA Mini Kit)
- InnuSPEED Lysis Tube B
- 250 QIAamp Mini Spin Columns
- QIAGEN Proteinase K
- Collection Tubes (2 ml)
- Aqua dest. HPLC Gradient Grad (Roth)
- HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen)
- PCR Nucleotide Mix dntps (Qiagen)
- PCR primer: 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3' (16S)

5'-CCCTGCACCCTT-AATAACTTGACC-3' (23S)

└ 5' markiert mit 6-Carboxylfluorescein (6-FAM)

(nach Bidet et al., 1999)

- GeneScan 1200 LIZ Size Standard
- HiDi Formamide
- 96er-Platten für die Ribotypisierung
- *C. difficile* ATCC 9689

Analysengerät:

- ANOXOMAT MART und dazugehörige Anaerobiertöpfe
- Thermocycler (BIORAD)
- Nano-Drop 2000c™ (PEQLAB)
- Zentrifuge

3.9 Statistische Analyse

Alle fortlaufenden Variablen wurden jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst. Die qualitativen Daten wurden nach Schätzung und Prozent bewertet. Proben mit fehlenden Werten wurden aus der Studie, entsprechend der dazugehörigen Variablen, ausgeschlossen. Der Vergleich der Mittelwerte (CT value) wurde anhand des Student's t Test (beim Vergleich zweier Gruppen, z. B. Stuhlproben und Rektalabstriche) und der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt, falls mehr als zwei Gruppen verglichen wurden (Daten von drei unterschiedlichen Zeitpunkten). Der Vergleich der Proportionen wurde durch den Chi-square Test erhoben. Sensitivität, Spezifität, negativ prognostische Werte und positiv prognostische Werte für den Nachweis von *C. difficile* in Rektalabstrichen wurden bewertet im Vergleich zum Nachweis von *C. difficile* in Stuhlproben. Alle statistischen Tests waren zweiseitige Tests. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich Nachweis von *C. difficile* mittels PCR in Stuhlproben und Rektalabstrichen (ZP1)

Die Ergebnisse von 30 Stuhlproben, die mittels PCR auf *C. difficile* getestet wurden, wurden zunächst mit den PCR-Ergebnissen der 30 Fecal Swabs (FS), die direkt nach der Simulation des Rektalabstriches getestet wurden, verglichen.

Die Sensitivität der Detektion von *C. difficile* mittels PCR war in FS signifikant niedriger als in den Stuhlproben (25/30 [83.3%] versus 30/30 [100%]; $p = 0.02$) (Abb. 11).

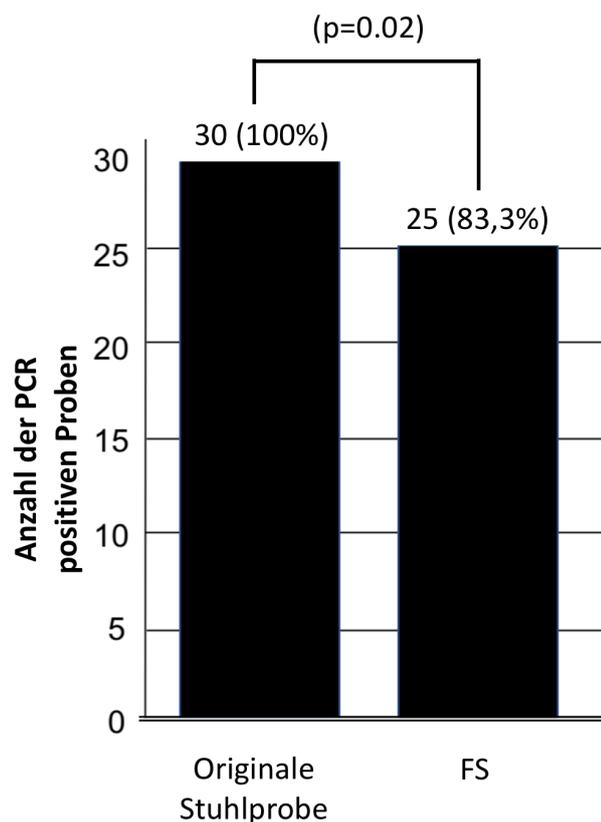


Abb.11: Nachweis von *C. difficile* durch PCR aus den Stuhlproben und aus den Rektalabstrichen (FS), die direkt nach der Simulation getestet wurden. Die Sensitivität der Detektion von *C. difficile* mittels PCR war in FS signifikant niedriger als in den Stuhlproben (25/30 [83.3%] versus 30/30 [100%]; $P = 0.02$)

Die Untersuchung der CT Werte des Toxin B Gens (tcdB) von den positiven Proben (n=25), zeigte in FS signifikant höhere Werte, als in den Stuhlproben (Mittelwert $CT_{\text{Abstriche}}$, 28.4 ± 3.6 , versus Mittelwert CT_{Stuhl} , 25.2 ± 2.8 ; $p = 0.004$) (Abb.12).

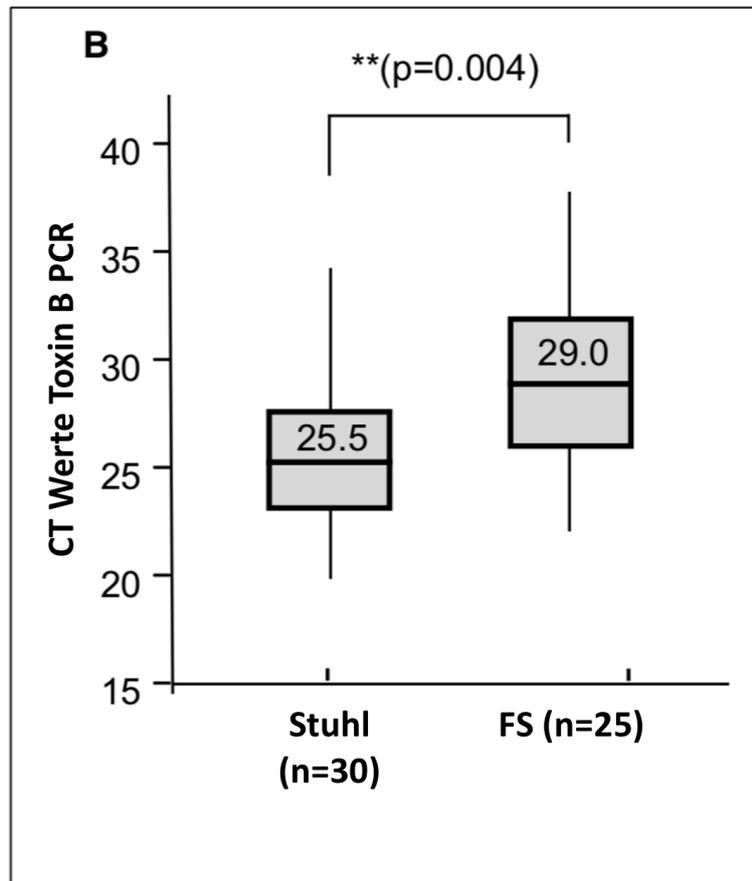


Abb.12: Vergleich der *C. difficile* Toxin B PCR Cycle Threshold (CT) Werte von Stuhlproben (n=30) und COPAN Rektalabstrichen FS (n=25) direkt nach der Simulation. Die horizontale Linie in jeder Box zeigt den Mittelwert, wohingegen die unteren Linien das erste Quartil und die oberen Linien das dritte Quartil darstellen. Patienten, deren Daten unvollständig waren, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen (n = 5).

*Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen Stuhlprobe und Rektalabstrich ($p=0.004$) gefunden.

4.2 Vergleich Nachweis von *C. difficile* mittels C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE (CDQCC) in Stuhlproben und in Rektalabstrichen (ZP1)

Die Ergebnisse von 30 Stuhlproben, die mittels C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE (CDQCC) auf *C. difficile* getestet wurden, wurden zunächst mit den C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE (CDQCC)-Ergebnissen der 30 Fecal Swabs (FS), die direkt nach der Simulation des Rektalabstriches getestet wurden, verglichen. Es wurde jeweils GDH und Toxin A/B untersucht.

GDH konnte in 25 Stuhlproben (25/30 [83.3%]) und in 22 FecalSwabs (22/30 [73.3%]) nachgewiesen werden ($p=0.35$).

Toxin A/B konnte in 16 Stuhlproben (16/30 [53.3%]) und in 11 FecalSwabs (11/30 [36.3%]) nachgewiesen werden ($p=0.19$).

Somit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich zwischen dem Nachweis von *C. difficile* in FS und Stuhlproben, die durch den CDQCC bestimmt wurden (Abb.13).

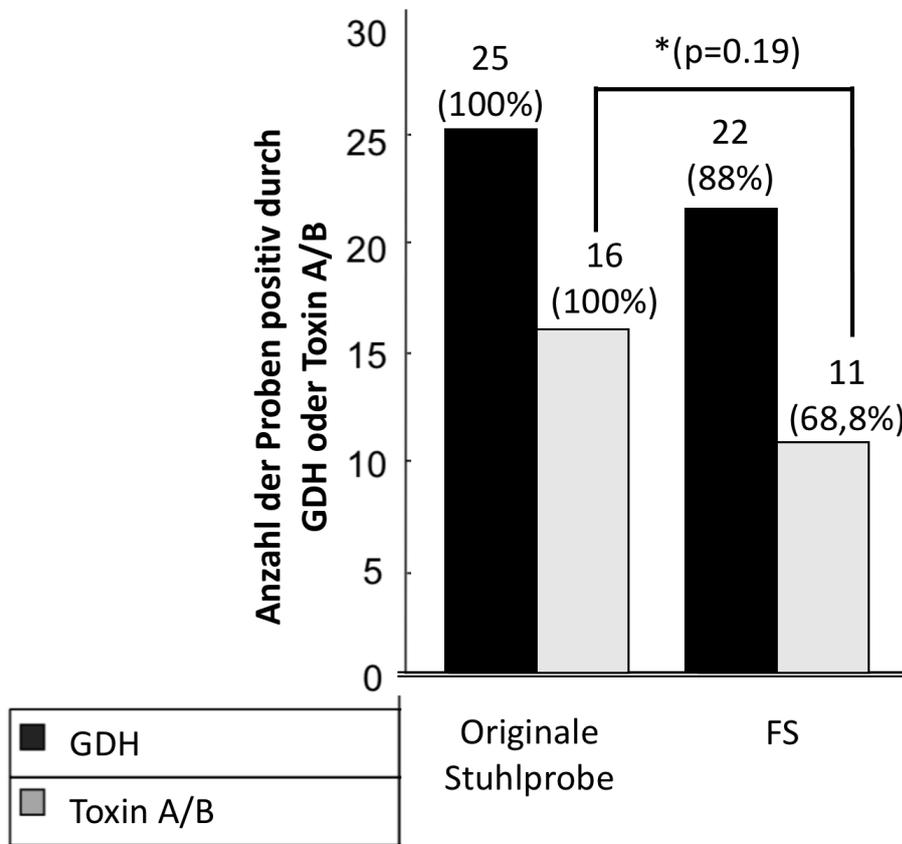


Abb.13: CDQCC. Nachweis von *C. difficile* durch C. DIFF QUIK CHECK COMPLETE (CDQCC) GDH (schwarzer Balken) und Toxin A/B (grauer Balken) in klinischen Stuhlproben und in COPAN FecalSwabs (FS), direkt nach der Simulation des Rektalabstriches. Bei der Nachweisrate von *C. difficile* getestet durch GDH (p=0.35) und durch Toxin A/B (p=0.19) waren in FS im Vergleich zur Stuhlprobe, keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

4.3 Vergleich Nachweis von *C. difficile* mittels toxigener Kultur (TK) in Stuhlproben und in Rektalabstrichen (FS) (ZP1)

Die Ergebnisse der toxigenen Kultur zum Nachweis von *C. difficile* in den Stuhlproben (n=30) und in Fecal Swabs (n=30) wurde verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. *C. difficile* wurde mittels toxigener Kultur in FS und Stuhlproben gleich häufig nachgewiesen (21/21 [100%]) (Abb. 14).

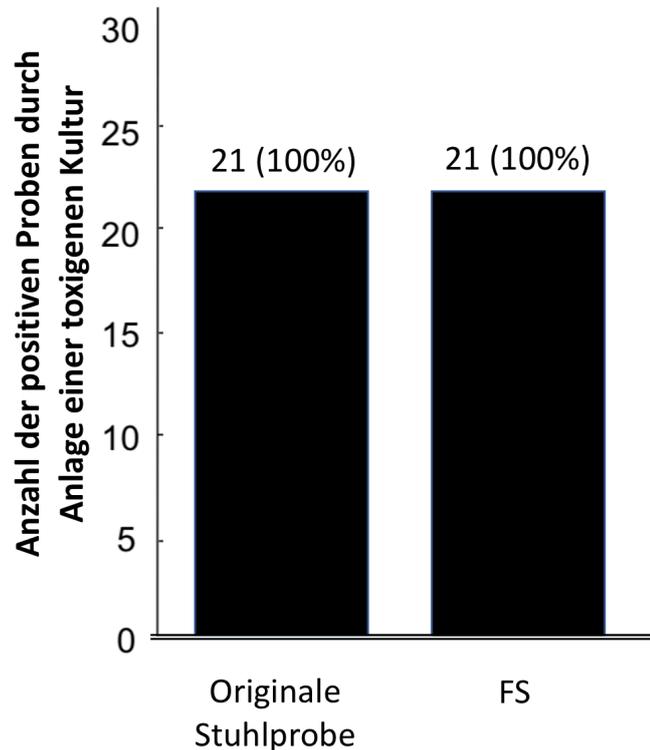


Abb.14: Toxigene Kultur. Nachweis von *C. difficile* durch die Anlage einer toxigenen Kultur mit klinischen Stuhlproben und in COPAN FecalSwabs (FS), direkt nach der Simulation der Rektalabstriche (FS). Die Anzahl der positiven Proben durch Anlage einer toxigenen Kultur ist in beiden Fällen gleich.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse des Vergleichs von Stuhlproben und Rektalabstrichen zusammengefasst dargestellt.

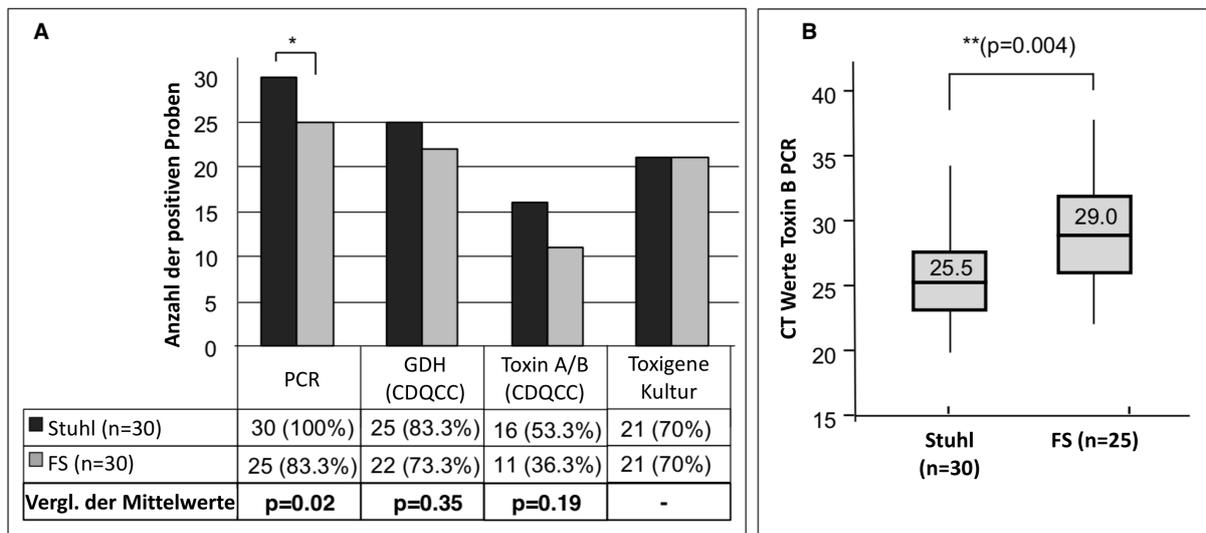


Abb.15: Zusammenfassung Nachweis von *C. difficile* durch PCR, CDQCC und TC in Rektalabstrichen mit Transportmedium (FS) im Vergleich zu Stuhlproben.

(A) Nachweis von *C. difficile* durch PCR, C. Diff Quik Chek Complete (GDH und Toxin A/B) (CDQCC) und durch toxische Kultur (TC) in klinischen Stuhlproben und in FS. *, die Detektionsrate von *C. difficile* durch PCR war signifikant niedriger durch Benutzung des FS ($P < 0.02$).

(B) Vergleich des *Clostridioides difficile* Toxins B PCR Cycle Theshold (CT) Werte der Stuhlproben ($n = 30$) und FS ($n = 25$). Die horizontale Linie in jeder Box zeigt den Mittelwert, wohingegen die unteren Linien das erste Quartil und die oberen Linien das dritte Quartil darstellen. Patienten, deren Daten unvollständig waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen ($n = 5$). **, ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den CT Werten der Stuhlproben und der FS gefunden ($P = 0.004$).

4.4 Untersuchung des Einflusses der Lagerung von Rektalabstrichen bei -80°C auf den Nachweis von *C. difficile* mittels PCR, CDQCC und toxigener Kultur

Der Einfluss der Lagerung von FS bei -80°C für 1 Monat und für 3 Monate auf den Nachweis von *C. difficile* durch PCR, CDQCC (GDH und Toxin A/B) und toxigener Kultur wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz untersucht. Dazu wurden alle FS nach der ersten Testung aufrecht und in Ständern sortiert bei -80°C tiefgefroren. Bei einer anstehenden Testung wurden die Röhrchen eine Stunde vor Testung, zum Auftauen, aus dem Tiefkühlschrank genommen. Der verflüssigte Inhalt der Proben wurde gevortext und es wurde an ZP2 (nach Lagerung für 1 Monat bei -80°C) und respektive an ZP3 (nach Lagerung für 3 Monate bei -80°C) aus der eingefrorenen Flüssigkeit die PCR, der CDQCC (GDGH und Toxin A/B) und die toxigene Kultur durchgeführt und die Ergebnisse miteinander und mit ZP1 (direkt nach der Simulation des Rektalabstrichs) verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch Lagerung des FS bei -80 °C über 3 Monate, keine signifikante Veränderung der Sensitivität der verwendeten Tests zum Nachweis von *C. difficile* gab. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

Wie aus der Abbildung ersichtlich hat die Lagerung der FS auf die PCR keinerlei Auswirkungen. Alle 25 Proben, die bei ZP1 positiv getestet wurden, wurden auch bei ZP2 und ZP3 positiv getestet. Zudem zeigte sich auch bei den CT-Werten (ZP1=29,0, ZP2=30,1 und ZP3=29,9) kein Unterschied.

Auch bei der Verwendung des Toxin A/B Test zeigte sich kein Einfluss der Lagerung bei -80°C. An ZP1 waren 11 der 30 Proben (36,6%) positiv im Toxin A/B-Test, bei ZP2 und ZP3 je 13 der 30 Proben (43,3%). Auch beim Nachweis des *C. difficile* GDH gab es keinen Einfluss der Lagerung zu beobachten. Bei ZP1 waren 22 der 30 Proben GDH positiv (73,3%), bei ZP2 25 (83,3%) und bei ZP3 23 (76,6%). Auch bei der Anzucht war kein signifikanter Einfluss der Lagerung zu erkennen (Abb. 16).

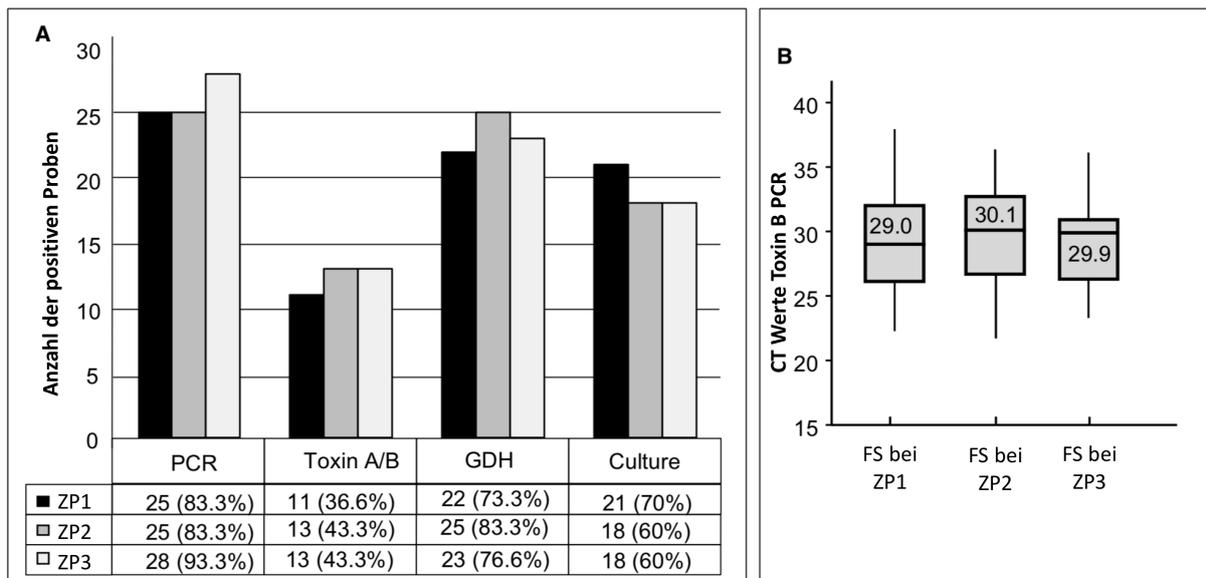


Abb.16: Nachweis von *C. difficile* durch PCR, CDQCC und TC aus Rektalabstrichen mit Transportmedium (FS) vor und nach Lagerung bei -80°C.

(A) Nachweis von *C. difficile* durch PCR, C. Diff Quik Chek Complete (Toxin A/B und GDH) und durch eine toxische Kultur aus Rektalabstrichen mit FS (n = 30) unmittelbar nach dem Abstrich (ZP1), nach einem Monat der Lagerung (ZP2) und nach drei Monaten der Lagerung (ZP3). Keine signifikanten Unterschiede wurden vor und nach der Lagerung gefunden.

(B) Vergleich der *Clostridioides difficile* Toxin B PCR Cycle Threshold (CT) Werte von FS (n = 25) bei ZP1, ZP2 und ZP3. Die horizontale Linie in jeder Box zeigt den Mittelwert, wohingegen die unteren Linien das erste Quartil und die oberen Linien das dritte Quartil darstellen. Patienten, deren Daten unvollständig waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen (n = 5). Kein signifikanter Unterschied wurde gefunden zwischen den CT Werten von FS vor und nach der Lagerung.

4.5 Testcharakteristika in Stuhlproben und Rektalabstrichen

Die Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersage Wert (PPW) und negativer Vorhersage-Wert (NPW) für die Detektion von *C. difficile* in FS und in Stuhlproben wurde für die unterschiedlichen Tests kalkuliert (PCR, GDH, Toxin A/B, und Toxigene Kultur). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 beschrieben.

Performance der Rektalabstriche zur Detektion von <i>C. difficile</i> durch verschiedene diagnostische Prüfverfahren						
Assay und Ergebnisse des Nachweises von <i>C. difficile</i> in FS	Ergebnisse des Nachweises von <i>C. difficile</i> in Stuhlproben		Performance der Rektalabstriche im Vergleich zu Stuhlproben			
	Positiv	Negativ	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPW (%)	NPW (%)
GeneXpert			83.3% (64.5 - 93.7)	-	100% (83.4 - 100)	-
Positiv	25	0				
Negativ	5	0				
Gesamt (n=30)	30	0				
Toxigene Kultur			85.7% (62.6 - 96.2)	66.7% (30.9 - 91)	85.7% (62.6 - 96.2)	66.7% (30.9 - 91)
Positiv	18	3				
Negativ	3	6				
Gesamt (n=30)	21	9				
GDH (CDQCC)			88% (67.7 - 96.8)	100% (46.3 - 100)	100% (81.5 - 100)	62.5% (25.9 - 89.8)
Positiv	22	0				
Negativ	3	5				
Gesamt (n=30)	25	5				
Toxin A/B (CDQCC)			68.8% (41.5 - 87.9)	100% (73.2 - 100)	100% (67.9 - 100)	73.7% (48.6 - 89.9)
Positiv	11	0				
Negativ	5	14				
Gesamt (n=30)	16	14				

FS, Rektalabstrich mit Flüssigmedium; CDQCC, C DIFF QUIK CHECK COMPLETE;
PPW, positiver prädiktiver Wert; NPW, negativer prädiktiver Wert;

Tab.2: Sensitivität, Spezifität, PPW und NPW von 30 Rektalabstrichen mit Flüssigmedium zum Nachweis von *Clostridioides difficile* im Vergleich zu Stuhlproben.

4.6 Ribotypisierung der *C. difficile* Isolate

Insgesamt wurden 24 *C. difficile* Isolate mittels toxigener Kultur gewonnen (18 Isolate stimmten in Rektalabstrichen und in Stuhlproben überein, 3 Isolate konnten nur durch die Stuhlprobe wiedergewonnen werden und weitere 3 Isolate nur durch Rektalabstriche) und erfolgreich charakterisiert durch PCR-Ribotypisierung. Der am weitesten verbreitete Ribotyp war RT027 (5/24 [21%]), gefolgt von Ribotyp RT014/6 (3/24 [13%]). Für keinen der genutzten Tests wurde eine Wechselbeziehung zwischen den Ribotypen und dem diagnostischen Ergebnis gefunden.

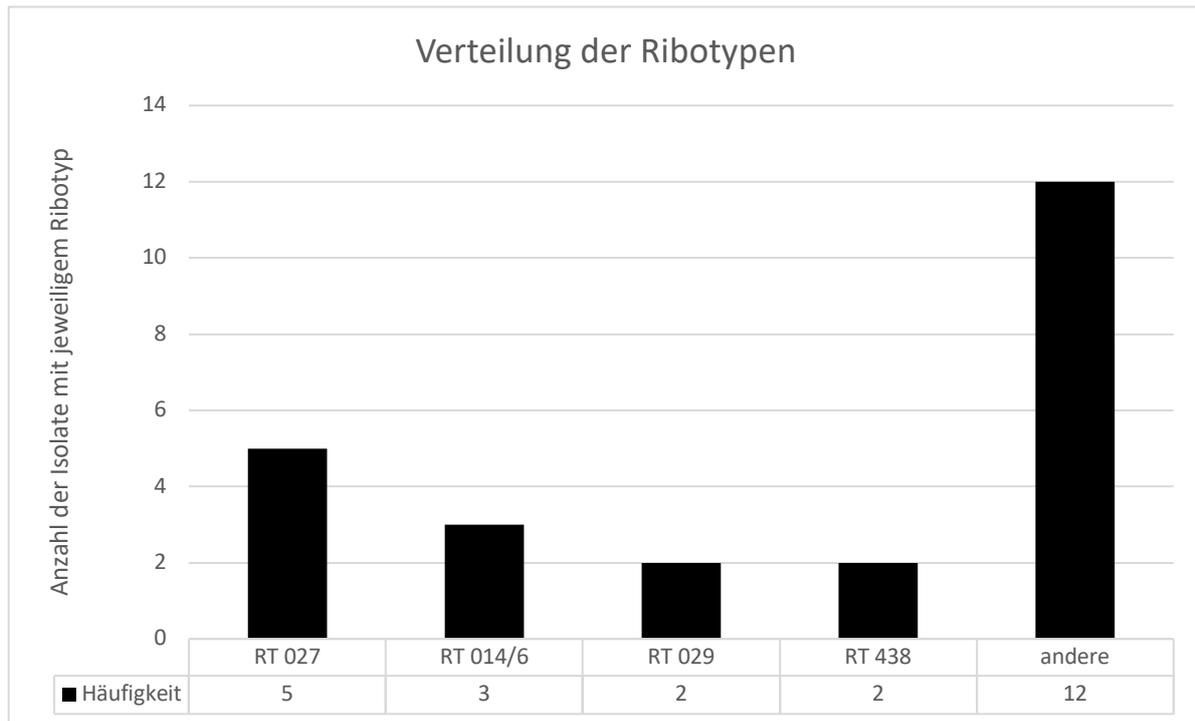


Abb.17: Charakterisierung der Ribotypen anhand der Isolate. Der am weitesten verbreitete Ribotyp war RT 027 (5/24 [21%]), gefolgt von Ribotyp RT 014/6 (3/24 [13%]), Ribotyp RT 029 und RT 438 waren gleich verbreitet (2/24 [8%]), auch nicht weiter spezifizierte Ribotypen fanden sich (12/24 [50%]).

5. Diskussion

Diese Studie wurde ausgeführt um den Nutzen des Copan FecalSwabs, einem System aus Rektalabstrich mit flüssigem Transportmedium, für die CDI Diagnostik zu beurteilen. Zudem wurde der Einfluss der Lagerung der Rektalabstriche bei -80°C auf den Nachweis von *C. difficile* untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von FecalSwabs (FS) keine Alternative zu einer Stuhlprobe für die Labordiagnostik einer CDI darstellt. Die Nachweisrate von *C. difficile* mittels PCR aus FecalSwabs war signifikant niedriger im Vergleich zu der Nachweisrate aus Stuhlproben (25/30 vs. 30/30, $p=0.02$). Die kalkulierte Sensitivität für den *C. difficile* Nachweis mittels PCR für die Erkennung von *C. difficile* in Rektalabstrichen im Vergleich zu Stuhlproben lag bei 83.3% (Konfidenzintervall +/- 69.5 – 93.7).

Durch den Vergleich der CT-Werte lässt sich der Verdünnungseffekt der Stuhlprobe in den 2ml Liquid Amies Medium als wahrscheinlichste Ursache für die schlechtere Performance ausmachen.

Für den Nachweis von GDH und Toxin A/B zeigte sich in unserer Studie ein Trend, der die Unterlegenheit von Rektalabstrichen aufzeigt. Wegen der geringen Fallzahl konnte hier keine Signifikanz erreicht werden.

Die Lagerung der Abstriche bei -80°C über 3 Monate hatte keinen Einfluss auf alle durchgeführten Tests in dieser Studie.

Die Idee der Rationalisierung der *C. difficile* Diagnostik, durch benutzerfreundliche Rektalabstriche (anstatt der Stuhlprobe) ist nicht neu. McFarland et al. erklärte im Jahr 1987 erstmals, dass die Benutzung von Rektalabstrichen mit halbflüssigen Amies Transportmedium für die Anlage einer *C. difficile* Kultur vergleichbar ist wie die Anlage aus einer Stuhlproben [45].

Seitdem hat sich gezeigt, dass das Benutzen von Rektalabstrichen (oder Perirektalabstrichen) für den Nachweis von *C. difficile* in asymptomatischen Trägern durch PCR und/oder durch die Anlage einer toxigenen Kultur hilfreich sein kann [46, 47].

Folglich wurden im Rahmen von Studien häufig Rektalabstriche für den Nachweis von *C. difficile* bei asymptomatischen Trägern benutzt [3, 4, 48]. In einer kleinen Studie mit 22 symptomatischen Patienten, die unter Verdacht einer CDI standen wurde der Gebrauch von Rektalabstrichen als geeignet für die CDI Diagnostik mittels PCR beschrieben [49]. In dieser Studie wurde allerdings nur eine Echtzeit PCR durchgeführt, keine Bestätigungstests. Es existieren keine Daten zur Benutzung von Rektalabstrichen zur Routinediagnose von CDI im Labor bei symptomatischen Patienten unter Verwendung eines zweistufigen Algorithmus, wie

es von den ESCMID Richtlinien empfohlen wird, einschließlich einer sensitiven Untersuchung (PCR oder GDH) und eines spezifischeren Bestätigungsassays (*C. difficile* Toxin A/B EIA) [12, 13].

Kürzlich haben Hirvonen et al. gezeigt, dass die Verwendung von flüssigen Transportmedien von Rektalabstrichen die Nachweisrate von durchfallauslösenden Keimen verbessert [17]. Dieses Abstrichsystem besitzt einen beflochtene Tupfer, der laut Hersteller, die gesamte Stuhlprobe aus dem Tupfer in dem flüssigen Cary-Blair Medium diluiert. Folglich können alle Tests, die für die Diagnose der CDI nötig sind, potentiell aus dem flüssigen Medium eines Abstriches gemacht werden. In der zitierten Studie wurden in einer kleinen Subuntersuchung auch Patientenproben mit V.a. CDI eingeschlossen und mittels Kultur, PCR und Toxin A/B Test untersucht. Es zeigte sich hier in der Kultur und PCR kein Unterschied zu den „herkömmlich verwendeten Transportmedien“, wobei diese nicht näher spezifiziert waren und nur eine geringe Probenanzahl verwendet wurde (n=20). Der Toxin A/B Test aus den Flüssigmedien zeigte eine schlechte Performance (6 von 20 PCR-positiven Proben).

In unserer Studie war die Detektionsrate von *C. difficile* mittels PCR aus flüssigem Cary-Blair Medium von Rektalabstrichen signifikant niedriger als die aus Stuhlproben. Die Analyse des Toxin B Gen CT-Wertes lässt vermuten, dass dieses Ergebnis ein Resultat des Verdünnungseffektes ist (eine kleine Menge der Stuhlprobe wurde aufgelöst in 2 ml des flüssigen Transportmediums).

Darüber hinaus ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass der Verdünnungseffekt das Verhalten des GDH und Toxin A/B ELISA und der toxigenen Kultur ebenfalls beeinflusst, auch wenn dies in unserer Studie auf Grund der geringen Probenanzahl nicht nachweisbar war.

Auch wenn neuere Studien den Schluss ziehen, dass Rektalabstriche mit Cary-Blair Medium für den molekularen Nachweis von pathogenen Keimen ohne eine Kreuzreaktion oder einen hemmenden Effekt benutzt werden können, kann dies zur Diagnostik von CDI nach unseren Ergebnissen nicht für den Nachweis von *C. difficile* mittels PCR gelten [17, 50].

Die Daten in dieser Studie zeigen deutlich, dass die Lagerung der Rektalabstriche mit Flüssigmedium bei -80°C für 3 Monate keinen Einfluss auf den Nachweis von *C. difficile* bei allen Testmethoden hat. Dies stimmt mit den Daten von Hirvonen und Kaukoranta überein. Diese zeigten ebenfalls, dass die Lagerung des FS bei -70°C keinen Effekt auf die Sensitivität der *C. difficile* Kultur hat. Wohingegen eine Lagerung des FS bei 4°C oder die Lagerung bei Zimmertemperatur zu einer erheblich geringeren Nachweisrate von *C. difficile* führt [17].

Die hier vorgestellte Studie hat einige Limitationen. Zum einen wurde der Rektalabstrich mit positiven *C. difficile* Stuhlproben nur simuliert und nicht am Patienten durchgeführt. Folglich

sollten die Daten dieser Studie in einer prospektiven klinischen Studie mit beiden Verfahren (Rektalabstriche und Stuhlproben) am Patienten gleichzeitig untersucht werden.

Überdies wurden in der vorgestellten Arbeit nur positive *C. difficile* Stuhlproben eingeschlossen. Das könnte Einfluss auf die Sensitivität der Analysen genommen haben.

Schlussendlich kann durch die vorliegende Studie gezeigt werden, dass die Verwendung eines Rektalabstrichs mit Flüssigmedium für die zweistufige Labordiagnose einer CDI keine Alternative zur Stuhlprobe darstellt. Dies ergab sich aus den niedrigeren Sensitivitäten, die bei Benutzung der Abstriche bei allen Assays im Vergleich zum Goldstandard (der Stuhlprobe) entstanden.

Es existieren kleine Studien an Patienten, die zeigen, dass die PCR zum Nachweis von *C. difficile* aus Rektalabstrichen generell zuverlässig ist [49]. Diese Studien verwenden allerdings Abstriche ohne Transportmedium. In diesem Falle kommt es nicht zur Verdünnung im Flüssigmedium. Dafür sind aus einem Abstrich ohne Flüssigmedium aber nicht alle Untersuchungen durchführbar, die für die Routinediagnostik nach ESCMID-Leitlinien notwendig sind. Es muss entschieden werden, ob der Abstrich mittels PCR oder Kultur untersucht werden soll. Ein ELISA aus einem trockenen Abstrich ist ohne Elution (und damit Verdünnung) nicht ohne weiteres möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es aufgrund der Ergebnisse dieser Studie nicht empfohlen werden kann die zweistufige Labordiagnose einer CDI aus Rektalabstriche mit Flüssigtransportmedium durchzuführen, da die Sensitivitäten (insbesondere für die Screeningtests PCR und GDH) zu niedrig sind. Eine Lagerung des Rektalabstrichs im Flüssigmedium bei -80°C über 3 Monate hinweg ist aber ohne Beeinträchtigung der Detektionsrate von *C. difficile* möglich.

6. Literaturverzeichnis

1. Scheurer, D., *Diagnostic and treatment delays in recurrent Clostridium difficile-associated disease*. J Hosp Med, 2008. **3**(2): p. 156-9.
2. Frenz, M.B. and A.S. McIntyre, *Reducing delays in the diagnosis and treatment of Clostridium difficile diarrhoea*. QJM, 2003. **96**(8): p. 579-82.
3. Longtin, Y., B. Paquet-Bolduc, R. Gilca, C. Garenc, E. Fortin, J. Longtin, S. Trottier, P. Gervais, J.F. Roussy, S. Levesque, D. Ben-David, I. Cloutier and V.G. Loo, *Effect of Detecting and Isolating Clostridium difficile Carriers at Hospital Admission on the Incidence of C difficile Infections: A Quasi-Experimental Controlled Study*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(6): p. 796-804.
4. Johnson, S., C.R. Clabots, F.V. Linn, M.M. Olson, L.R. Peterson and D.N. Gerding, *Nosocomial Clostridium difficile colonisation and disease*. Lancet, 1990. **336**(8707): p. 97-100.
5. Gastmeier, P., M. Behnke, A.C. Breier, B. Piening, F. Schwab, M. Dettenkofer and C. Geffers, *[Healthcare-associated infection rates: measuring and comparing. Experiences from the German National Nosocomial Infection Surveillance System (KISS) and from other surveillance systems]*. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 2012. **55**(11-12): p. 1363-9.
6. Geffers, C. and P. Gastmeier, *Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System)*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(6): p. 87-93.
7. Meyer, E., F. Schwab, B. Schroeren-Boersch and P. Gastmeier, *Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant E. coli in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008*. Crit Care, 2010. **14**(3): p. R113.
8. Deshpande, A., V. Pasupuleti, P. Thota, C. Pant, D.D. Rolston, T.J. Sferra, A.V. Hernandez and C.J. Donskey, *Community-associated Clostridium difficile infection and antibiotics: a meta-analysis*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(9): p. 1951-61.
9. Ott, E., S. Saathoff, K. Graf, F. Schwab and I.F. Chaberny, *The prevalence of nosocomial and community acquired infections in a university hospital: an observational study*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(31-32): p. 533-40.
10. Loo, V.G., A.M. Bourgault, L. Poirier, F. Lamothe, S. Michaud, N. Turgeon, B. Toye, A. Beaudoin, E.H. Frost, R. Gilca, P. Brassard, N. Dendukuri, C. Beliveau, M. Oughton, I. Brukner and A. Dascal, *Host and pathogen factors for Clostridium difficile infection and colonization*. N Engl J Med, 2011. **365**(18): p. 1693-703.
11. Lubbert, C., E. John and L. von Muller, *Clostridium difficile infection: guideline-based diagnosis and treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(43): p. 723-31.
12. Debast, S.B., M.P. Bauer and E.J. Kuijper, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014. **20 Suppl 2**: p. 1-26.
13. Crobach, M.J., T. Planche, C. Eckert, F. Barbut, E.M. Terveer, O.M. Dekkers, M.H. Wilcox and E.J. Kuijper, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for Clostridium difficile infection*. Clin Microbiol Infect, 2016. **22 Suppl 4**: p. S63-81.
14. Van Horn, K.G., C.D. Audette, D. Sebeck and K.A. Tucker, *Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(5): p. 1655-8.
15. Van Horn, K.G., C.D. Audette, K.A. Tucker and D. Sebeck, *Comparison of 3 swab transport systems for direct release and recovery of aerobic and anaerobic bacteria*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **62**(4): p. 471-3.
16. Nys, S., S. Vijgen, K. Magerman and R. Cartuyvels, *Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of Escherichia coli, Streptococcus agalactiae and Candida albicans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(4): p. 453-6.

17. Hirvonen, J.J. and S.S. Kaukoranta, *Comparison of FecalSwab and ESwab devices for storage and transportation of Diarrheagenic bacteria*. Journal of clinical microbiology, 2014. **52**(7): p. 2334-9.
18. Hall I., O.T.E., *Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerob, Bacillus difficile*. Arch Pediatr Adolesc Med, 1935. p. **390-402**.
19. Tedesco, F.J., R.W. Barton and D.H. Alpers, *Clindamycin-associated colitis. A prospective study*. Ann Intern Med, 1974. **81**(4): p. 429-33.
20. Bartlett, J.G., N. Moon, T.W. Chang, N. Taylor and A.B. Onderdonk, *Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis*. Gastroenterology, 1978. **75**(5): p. 778-82.
21. Lawson, P.A., D.M. Citron, K.L. Tyrrell and S.M. Finegold, *Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938*. Anaerobe, 2016. **40**: p. 95-9.
22. Leekha, S., K.C. Aronhalt, L.M. Sloan, R. Patel and R. Orenstein, *Asymptomatic Clostridium difficile colonization in a tertiary care hospital: admission prevalence and risk factors*. Am J Infect Control, 2013. **41**(5): p. 390-3.
23. Bartlett, J.G., *Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea*. N Engl J Med, 2002. **346**(5): p. 334-9.
24. Lessa, F.C., Y. Mu, W.M. Bamberg, Z.G. Beldavs, G.K. Dumyati, J.R. Dunn, M.M. Farley, S.M. Holzbauer, J.I. MEEK, E.C. Phipps, L.E. Wilson, L.G. Winston, J.A. Cohen, B.M. Limbago, S.K. Fridkin, D.N. Gerding and L.C. McDonald, *Burden of Clostridium difficile infection in the United States*. N Engl J Med, 2015. **372**(9): p. 825-34.
25. Claro, T., S. Daniels and H. Humphreys, *Detecting Clostridium difficile spores from inanimate surfaces of the hospital environment: which method is best?* J Clin Microbiol, 2014. **52**(9): p. 3426-8.
26. Kelly, C.P. and J.T. LaMont, *Clostridium difficile--more difficult than ever*. N Engl J Med, 2008. **359**(18): p. 1932-40.
27. Bauer, M.P., D.W. Notermans, B.H. van Benthem, J.S. Brazier, M.H. Wilcox, M. Rupnik, D.L. Monnet, J.T. van Dissel, E.J. Kuijper and E.S. Group, *Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey*. Lancet, 2011. **377**(9759): p. 63-73.
28. Garg, S., Y.R. Mirza, M. Girotra, V. Kumar, S. Yoselevitz, A. Segon and S.K. Dutta, *Epidemiology of Clostridium difficile-associated disease (CDAD): a shift from hospital-acquired infection to long-term care facility-based infection*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(12): p. 3407-12.
29. Tariq, R., S. Singh, A. Gupta, D.S. Pardi and S. Khanna, *Association of Gastric Acid Suppression With Recurrent Clostridium difficile Infection: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Intern Med, 2017. **177**(6): p. 784-791.
30. Collini, P.J., M. Bauer, E. Kuijper and D.H. Dockrell, *Clostridium difficile infection in HIV-seropositive individuals and transplant recipients*. J Infect, 2012. **64**(2): p. 131-47.
31. McDonald, L.C., D.N. Gerding, S. Johnson, J.S. Bakken, K.C. Carroll, S.E. Coffin, E.R. Dubberke, K.W. Garey, C.V. Gould, C. Kelly, V. Loo, J. Shaklee Sammons, T.J. Sandora and M.H. Wilcox, *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)*. Clin Infect Dis, 2018. **66**(7): p. 987-994.
32. Ooijevaar, R.E., Y.H. van Beurden, E.M. Terveer, A. Goorhuis, M.P. Bauer, J.J. Keller, C.J.J. Mulder and E.J. Kuijper, *Update of treatment algorithms for Clostridium difficile infection*. Clin Microbiol Infect, 2018. **24**(5): p. 452-462.
33. Lubbert, C., L. Zimmermann, J. Borchert, B. Horner, R. Mutters and A.C. Rodloff, *Epidemiology and Recurrence Rates of Clostridium difficile Infections in Germany: A Secondary Data Analysis*. Infect Dis Ther, 2016. **5**(4): p. 545-554.
34. Wilcox, M.H., D.N. Gerding, I.R. Poxton, C. Kelly, R. Nathan, T. Birch, O.A. Cornely, G. Rahav, E. Bouza, C. Lee, G. Jenkin, W. Jensen, Y.S. Kim, J. Yoshida, L. Gabryelski, A. Pedley, K. Eves, R.

- Tipping, D. Guris, N. Kartsonis, M.B. Dorr, I. Modify and M.I. Investigators, *Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection*. N Engl J Med, 2017. **376**(4): p. 305-317.
35. van Nood, E., A. Vrieze, M. Nieuwdorp, S. Fuentes, E.G. Zoetendal, W.M. de Vos, C.E. Visser, E.J. Kuijper, J.F. Bartelsman, J.G. Tijssen, P. Speelman, M.G. Dijkgraaf and J.J. Keller, *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2013. **368**(5): p. 407-15.
 36. Schneider, T., *Clostridium Difficile Associated Diseases – an Emerging Problem*. Dtsch Arztebl 2007. **104**.
 37. McDonald, L.C., G.E. Killgore, A. Thompson, R.C. Owens, Jr., S.V. Kazakova, S.P. Sambol, S. Johnson and D.N. Gerding, *An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2433-41.
 38. Sunenshine, R.H. and L.C. McDonald, *Clostridium difficile-associated disease: new challenges from an established pathogen*. Cleve Clin J Med, 2006. **73**(2): p. 187-97.
 39. Di Bella, S., P. Ascenzi, S. Siarakas, N. Petrosillo and A. di Masi, *Clostridium difficile Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects*. Toxins (Basel), 2016. **8**(5).
 40. Kasper, D., A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, J.L. Jameson and J. Loscalzo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2015. **19th edition**.
 41. McDonald, L.C., D.N. Gerding, S. Johnson, J.S. Bakken, K.C. Carroll, S.E. Coffin, E.R. Dubberke, K.W. Garey, C.V. Gould, C. Kelly, V. Loo, J. Shaklee Sammons, T.J. Sandora and M.H. Wilcox, *Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)*. Clin Infect Dis, 2018. **66**(7): p. e1-e48.
 42. Singhal, N., M. Kumar, P.K. Kanaujia and J.S. Virdi, *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 791.
 43. Fawley, W.N., C.W. Knetsch, D.R. MacCannell, C. Harmanus, T. Du, M.R. Mulvey, A. Paulick, L. Anderson, E.J. Kuijper and M.H. Wilcox, *Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for Clostridium difficile*. PloS one, 2015. **10**(2): p. e0118150.
 44. Indra, A., S. Huhulescu, M. Schneeweis, P. Hasenberger, S. Kernbichler, A. Fiedler, G. Wewalka, F. Allerberger and E.J. Kuijper, *Characterization of Clostridium difficile isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping*. Journal of medical microbiology, 2008. **57**(Pt 11): p. 1377-82.
 45. McFarland, L.V., M.B. Coyle, W.H. Kremer and W.E. Stamm, *Rectal swab cultures for Clostridium difficile surveillance studies*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(11): p. 2241-2.
 46. Rogers, D.S., S. Kundrapu, V.C. Sunkesula and C.J. Donskey, *Comparison of perirectal versus rectal swabs for detection of asymptomatic carriers of toxigenic Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(10): p. 3421-2.
 47. Curry, S.R., J.L. Schlackman, T.M. Hamilton, T.K. Henderson, N.T. Brown, J.W. Marsh, K.A. Shutt, M.M. Brooks, A.W. Pasculle, C.A. Muto and L.H. Harrison, *Perirectal swab surveillance for Clostridium difficile by use of selective broth preamplification and real-time PCR detection of tcdB*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3788-93.
 48. Longtin, Y., R. Gilca and V.G. Loo, *Effect Of Detecting and Isolating Asymptomatic Clostridium difficile Carriers-Reply*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(10): p. 1573.
 49. Shakir, F.A., D. Thompson, R. Marlar and T. Ali, *A novel use of rectal swab to test for Clostridium difficile infection by real-time PCR*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(9): p. 1444-5.
 50. Silbert, S., A. Gostnell, C. Kubasek and R. Widen, *Evaluation of the New FecalSwab System for Maintaining Stability of Stool Samples Submitted for Molecular Tests*. J Clin Microbiol, 2017. **55**(5): p. 1588-1590.

7. Anhang (Curriculum Vitae/Approbationsurkunde)

CURRICULUM VITAE – Eva Kirpal

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 17. November 1984
Geburtsort: Aschaffenburg
Nationalität: deutsch
Telefon: 0157-80941992
E-Mail: eva.kirpal@gmail.com

CURRICULUM VITAE

Ab 01.10.2019 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Stefan Langner in Bessenbach

07.2018 - 10.2019 Mutterzeit

02.07.2019 Zahnärztliche Approbation

06.07.2018 Staatsexamen Zahnmedizin an der Medizinischen und Pharmazeutischen Universität Victor Babeş in Timisoara (Rumänien)

09.2012 - 07.2018 Zahnmedizinstudium an der Medizinischen und Pharmazeutischen Universität Victor Babeş in Timisoara (Rumänien)

2010-2012 Allgemeine Hochschulreife an der Berufsoberschule in Aschaffenburg

01.2007 - 10.2009 Tätigkeit als Groß- und Außenhandelskauffrau Veritas AG in Gelnhausen

01.2006 - 01.2007 Tätigkeit als Groß- und Außenhandelskauffrau Honda Motor Europe North GmbH in Offenbach

08.2003 - 01.2006 Berufsausbildung zur Kauffrau im Groß- und Außenhandel Honda Motor Europe North GmbH in Offenbach

2003 Mittlere Reife

VERÖFFENTLICHUNG

[1] Jazmati N, Kirpal E, Piepenbrock E, Stelzer Y, Vehreschild MJGT, Seifert H Evaluation of the use of rectal swabs for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection, Journal of Clinical Microbiology, Mai 2018

Laufach, den 01. Juni 2021



APPROBATIONSURKUNDE

Frau Eva Hildegard Kirpal,

geboren am 17. November 1984 in Aschaffenburg,

erfüllt die Voraussetzungen des § 2 des Gesetzes über
die Ausübung der Zahnheilkunde.

Mit Wirkung vom heutigen Tage wird ihr die

APPROBATION ALS ZAHNÄRZTIN

erteilt.

Die Approbation berechtigt zur Ausübung des zahnärztlichen Berufs.

Würzburg, den 2. Juli 2019

REGIERUNG VON UNTERFRANKEN



Weingart
Ltd. Regierungsdirektor

8. Veröffentlichung der Studienergebnisse



Evaluation of the Use of Rectal Swabs for Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection

N. Jazmati,^{a,b} E. Kirpal,^a E. Piepenbrock,^a Y. Stelzer,^a M. J. G. T. Vehreschild,^{b,c} H. Seifert^{a,b}

^aInstitute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany

^bGerman Centre for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Germany

^cDepartment I of Internal Medicine, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

ABSTRACT For the diagnosis of *Clostridium difficile* infection (CDI), microbiological testing is almost always accomplished through the analysis of stool specimens. We evaluated the performances of rectal swabs with liquid transport medium (FS) and nylon flocked dry swabs for the detection of *C. difficile*. Additionally, the impact on the diagnostic yield of storing swabs at -80°C for up to 3 months was evaluated. Sixty clinical stool samples positive for *C. difficile* by PCR were used for simulating rectal swabbing. FS and dry swabs were dipped into the stool and tested by PCR directly after swabbing at 1 and 3 months after storage at -80°C . Stool and the liquid medium of FS were additionally tested by a combination of glutamate dehydrogenase antigen (GDH) testing and toxin A/B enzyme immunoassay (EIA), as well as by toxigenic culture (TC). Using dry swabs, the PCR-based detection rate of *C. difficile* was equal to the rate using stool samples (30/30 [100%]), whereas the detection rate in FS was significantly lower (25/30 [83.2%]; $P = 0.019$). The sensitivities of FS for detecting *C. difficile* by PCR, TC, GDH testing, and toxin A/B EIA were 83.3%, 85.7%, 88%, and 68.9%, respectively. Storage of swabs at -80°C had no impact on the detection rate. FS cannot replace stool samples in the two-step laboratory diagnosis of CDI, as the sensitivities were too low, probably due to diluting effects of the fecal sample in the liquid medium. For simple PCR-based detection of *C. difficile*, dry swabs proved to be a suitable alternative to the use of stool samples.

KEYWORDS *Clostridium difficile*

Fast and accurate diagnosis of *Clostridium difficile* infection (CDI) is crucial for the management, infection control, and therapy of the disease. For the diagnosis of CDI, microbiological testing in Europe is almost always accomplished through the analysis of stool specimens, as recommended by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guideline (1).

Nevertheless, obtaining adequate stool specimens can be complicated, as patients may not deliver the sample on demand or, in case of ileus, patients may not produce stool at all. Additionally, a certain inconvenience for patients and nurses is associated with stool sample collection. Therefore, delays from the onset of diarrhea to the collection of stool specimens for testing are common (2, 3).

For surveillance and infection control studies (i.e., detection of asymptomatic *C. difficile* carriers), the use of rectal swabs for collection, transport, and storage of the fecal samples is common (4, 5).

The main limiting factor using rectal swabs for the laboratory diagnosis of CDI is the very small amount of stool obtained by rectal swabbing. Today in Europe, laboratory detection of *C. difficile* from clinical samples of symptomatic patients is based on a two-step combination of a highly sensitive with a highly specific testing procedure, such as PCR or a glutamate dehydrogenase antigen (GDH) test and toxin A/B enzyme

Received 14 March 2018. Returned for modification 2 April 2018. Accepted 30 April 2018.

Accepted manuscript posted online 2 May 2018.

Citation Jazmati N, Kirpal E, Piepenbrock E, Stelzer Y, Vehreschild MJGT, Seifert H. 2018. Evaluation of the use of rectal swabs for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 56:e00426-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00426-18>.

Editor Andrew B. Onderdonk, Brigham and Women's Hospital

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to N. Jazmati, nathalie.jazmati@uk-koeln.de.

immunoassay (EIA), as recommended by the ESCMID guidelines (1). Therefore, a certain amount of stool is needed, as the fecal sample has to be divided into aliquots for use in different testing procedures. Using conventional swabs, only one testing procedure can be performed from one swab (6). Recently, improvements in the swab tip material and the transport medium have greatly enhanced the recovery and viability of various microorganisms (7–10). This new generation of swabs elutes the entire fecal sample from the swab into the liquid medium. The medium enriched with the fecal sample can be split up into several aliquots. Thus, the requirements for a two-step laboratory diagnosis of CDI from rectal swabs are met. To our knowledge, the detection of *C. difficile* by all recommended testing procedures (PCR, combined GDH test toxin A/B EIA, and toxigenic culture) from only one swab with liquid transport medium has not been systematically investigated. Thus, in our study, we aimed to assess rectal swabs as an alternative to stool samples for the laboratory diagnosis of CDI. To this aim, we compared the detection rates of *C. difficile* for four different laboratory assays (PCR, GDH and toxin A/B detection, and toxigenic culture) in stool samples with the detection rates in swabs with liquid transport medium (FS). We additionally tested common nylon flocculated dry swabs in comparison to stool samples using real-time PCR for the detection of *C. difficile*. Furthermore, the influence of storage of FS and dry swabs at -80°C for up to 3 months on the detection rate of *C. difficile* was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Study design. The study was performed at the University Hospital Cologne in Germany. In July and August 2016, clinical stool samples sent to the laboratory of medical microbiology from patients suspected of having CDI were screened for *C. difficile* within 24 h of receipt by *C. difficile* real-time PCR. A total of 60 consecutive stool samples (one sample per patient) that tested positive for the toxin B gene (*tcdB*) by real-time PCR were used in this study. All PCR-positive clinical stool samples were additionally characterized by a combination of GDH testing and toxin A/B EIA, and by toxigenic culture (TC). For further characterization, capillary gel-based PCR ribotyping was performed on all recovered *C. difficile* isolates. The study was performed in two consecutive steps. The first 30 clinical stool samples that were positive for *C. difficile* in the study period were used for comparing stool samples to rectal swabs with liquid medium. The second set of 30 swabs were used for comparing stool samples and dry swabs. Even if testing “simulated” dry swabs by PCR is quite similar to testing stool samples, we added this part to our study design, as we aimed to analyze the durability and influence of storage conditions also for this type of swab.

Simulation of rectal swabbing. For a simulation of rectal swabbing, in a first round of tests, the tips of three (for testing at three different time points; see below) Copan FecalSwabs (Copan Italia, Brescia, Italy) with liquid Cary-Blair medium (FS) ($n = 30$) were gently dipped into one *C. difficile*-positive stool sample and wiped off carefully on the edge of the stool vial. In a second round of tests, 30 nylon flocculated dry swabs (article number 552c; Copan Italia) were used for simulating rectal swabbing in the same manner.

After “swabbing,” each swab was placed into the corresponding transport tube. For processing FS, the tube was vortexed for 10 s to allow the fecal sample to elute in the liquid medium. All swabs were processed by the same investigator, and care was taken to handle all swabs in the same manner to ensure that the amount of stool for each swab was similar. FS and dry swabs were then tested for *C. difficile* by real-time PCR immediately after simulating rectal swabbing and additionally after 1 and 3 months of storage at -80°C . FS were additionally tested by a combination of GDH testing and a toxin A/B EIA, and by TC at all three time points, and the results were compared to the results of the initial clinical stool sample used for simulating rectal swabbing (Fig. 1). Before testing frozen swabs, swabs were thawed at room temperature for 15 min, and the FS were vortexed for 30 s.

***C. difficile* detection laboratory workup. (i) *C. difficile* real-time PCR.** For the detection of *C. difficile* in clinical stool samples by PCR, the GeneXpert *C. difficile*/Epi test (GX test) (Cepheid, CA, USA), a multiplex real-time PCR that detects the toxin B gene (*tcdB*), the binary toxin gene (*cdt*), and a deletion at nucleotide (nt) 117 in the *tcdC* gene indicating the hypervirulent *C. difficile* ribotype 027, was used according to the manufacturer’s instructions. Cycle threshold (C_t) values for the detection of *tcdB* as a marker for *C. difficile* bacterial density in the sample were documented. Low C_t values indicate a greater amount of target genes. For testing dry swabs, these were placed into the sample reagent of the GX test, and the swabs were cut right above the vial. Vials were then vortexed for 10 s. The swabs placed in the reagent vial were discarded after testing. For testing FS, 400 μl of the FS medium was added to the GX sample reagent. The sample reagent vial was then vortexed for 10 s before testing according to the manufacturer’s instructions. The remaining liquid medium of FS was used for further testing (see below).

(ii) Combined GDH and toxin A/B enzyme immunoassay. The *C. Diff* Quik Chek Complete (Alere, Cologne, Germany) (CDQCC), a combined GDH and toxin A/B enzyme immunoassay, was used for the detection of GDH and toxin A/B, according to the manufacturer’s instructions. Stool samples were processed using 25 μl of liquid stool or a portion of formed stool with 2 mm diameter and 750 μl of

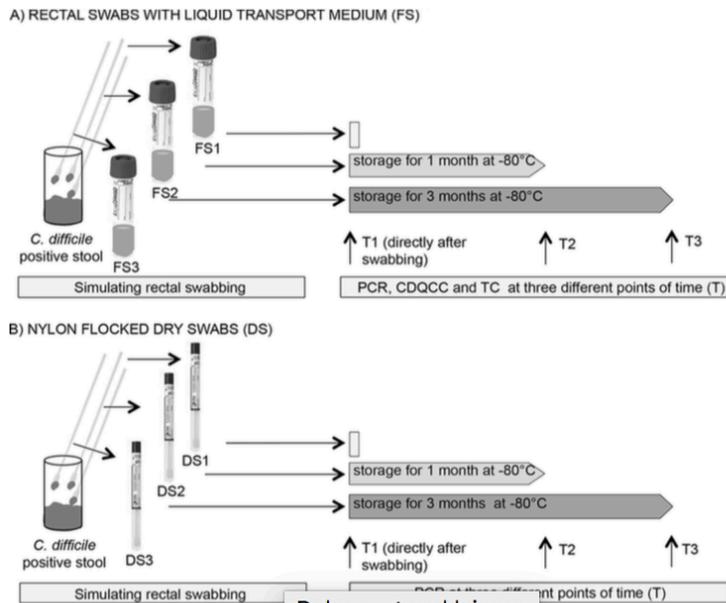


FIG 1 Study design. *C. difficile*-positive stool samples were used for simulating rectal swabbing. Either three swabs with fluid Cary-Blair medium (FS) (A) or three nylon flocked dry swabs (DS) (B) were gently dipped into the stool sample. FS and DS were then tested for *C. difficile* by PCR immediately after dipping the swab into the stool sample (T1), and 1 month (T2) and 3 months (T3) after storage at -80°C . FS were additionally tested by *C. Diff* Quik Chek Complete (CDQCC) for GDH and toxin A/B detection and by toxigenic culture (TC).

diluent. For testing FS, 100 μl of the liquid Cary-Blair transport medium with 650 μl of diluent were used, as recommended by the manufacturer.

(iii) **Toxigenic culture and PCR ribotyping.** For anaerobic culture of stool samples, a pea-sized portion of the stool sample was inoculated onto cycloserine cefoxitin fructose agar (CCFA; Oxoid Ltd., Thermo Fisher Scientific, Wesel, Germany), additionally subjected to alcohol shock, and inoculated onto nonselective Schaedler agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Agar plates were incubated anaerobically at 37°C and examined after 48 h. Initial identification was based on the characteristic colony morphology, followed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MALDI Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For the detection of toxin A/B production in the isolate, the *C. DIFFICILE* Tox A/B II test (Alere, Cologne, Germany) was performed according to the manufacturer's instructions. For testing FS, 50 μl of the liquid medium was used for inoculation of each agar plate. Plates were processed as mentioned above. Dry swabs were not tested by TC or the GDH and toxin A/B test. This was mainly because data for TC already exist (6), and for reliable detection of GDH and toxin A/B by lateral flow assays, dry swabs will not provide enough stool material (according to the manufacturer's instructions, a minimum of 2 mm diameter of stool material is required).

All recovered *C. difficile* isolates were further characterized using capillary gel-based PCR-ribotyping, according to published protocols (11). Analysis of the ribotyping results was done using WebRibo (<https://webribo.ages.at/>), an open-source software/database directed by the Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd., as described before (12).

Statistical analysis. Continuous variables were summarized by mean and standard deviation values. Qualitative variables were described by count and percentage. Samples with missing values were excluded in the analysis of the corresponding variable. Comparison of means (C_p value) was done by Student's *t* tests (if two groups were compared, e.g., stool samples and swabs) and by one-way analysis of variance (ANOVA), if more than two groups were compared (data from three different time points). A comparison of proportions was performed using the Chi-square test. Sensitivity, specificity, negative predictive value, and positive predictive value for the detection of *C. difficile* in rectal swabs were assessed in comparison to the detection of *C. difficile* in stool. All statistical tests were two-tailed, and a *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

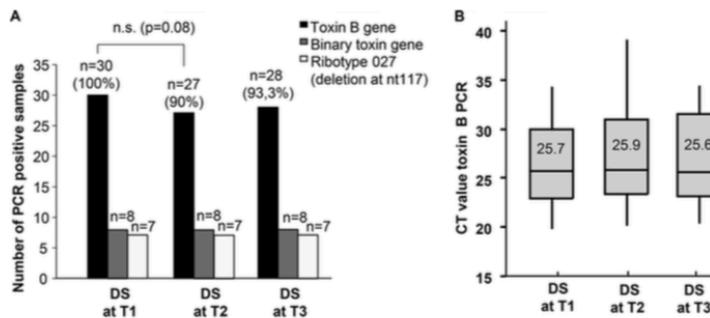


FIG 2 Detection of *C. difficile* by PCR in nylon flocked dry swabs (DS) before and after storage at -80°C . (A) Detection of the *C. difficile* toxin B gene, binary toxin gene, and ribotype 027 by PCR (GeneXpert) in DS ($n = 30$) immediately after swabbing (T1), after 1 month (T2) of storage, and after 3 months of storage (T3). No significant difference (n.s.) was found. (B) Comparison of the *Clostridium difficile* toxin B PCR cycle threshold (C_T) values of DS at different time points ($n = 26$ for T1 to T3). The horizontal line in each box indicates the median, whereas the top and bottom lines represent the 75th and 25th percentiles, respectively. Patients with missing values were excluded ($n = 4$). No significant difference was found between the C_T values at different points of time.

RESULTS

Detection of *C. difficile* by PCR in dry swabs. The results of 30 stool samples that tested positive for the toxin B gene by the GX test were compared to the results of 30 dry swabs tested directly after simulation of swabbing. No difference in the recovery rates of *C. difficile* by PCR between stool samples (30/30) and dry swabs (30/30) was found when testing dry swabs directly after the swabbing simulation. Thus, the sensitivity for the detection of *C. difficile* in dry swabs was 100%. Using the C_T values of the toxin B gene (*tcdB*) as a quantification marker of *C. difficile* in the sample, there was no difference between the C_T values measured in dry swabs and in stool samples (mean $C_{T_{\text{Swabs}}}$ 27.4 ± 4.8 , versus mean $C_{T_{\text{Stool}}}$ 27.2 ± 4.6 ; $P = 0.83$).

Also, no difference was found for the detection of *C. difficile* binary toxin gene (*cdt*) (8/8; mean $C_{T_{\text{Swabs}}}$ 25.4 ± 5.2) versus mean $C_{T_{\text{Stool}}}$ 24.9 ± 5.3 ; ($P = 0.87$) or for the detection of presumptive ribotype 027 (RT027) (7/7; mean $C_{T_{\text{Swabs}}}$ 27.2 ± 5.4 , versus mean $C_{T_{\text{Stool}}}$ 26.9 ± 5.2 ; ($P = 0.93$) between stool samples and dry swabs.

Influence of storage of dry swabs on the detection of *C. difficile* by PCR. We compared the detection rates of *C. difficile* by PCR in dry swabs before and after storage of the swabs at -80°C for 1 month and for 3 months. No significant differences were found in the detection of toxin B, binary toxin, or deletion at nt 117 (RT027) (Fig. 2A). C_T values (*tcdB*) were stable over the time of storage (Fig. 2B).

Detection of *C. difficile* by GX, CDQCC, and TC in FS. The results of 30 stool samples tested by GX, CDQCC, and TC were compared to the results of the 30 consecutive FS tested directly after the swabbing simulation. In FS, the detection rate of *C. difficile* by PCR was significantly lower than the detection rate in stool samples (25/30 [83.3%] versus 30/30 [100%]; $P = 0.02$) (Fig. 3A). Also, the C_T values of the toxin B gene (*tcdB*) in FS as a quantification marker of *C. difficile* in the sample were significantly higher than those in stool samples (mean $C_{T_{\text{Swabs}}}$ 28.4 ± 3.6 , versus mean $C_{T_{\text{Stool}}}$ 25.2 ± 2.8 ; $P = 0.004$) (Fig. 3B). Conversely, the comparison of proportions did not reveal any significant differences between *C. difficile* detection in FS and stool samples tested by CDQCC and by toxigenic culture (see Fig. 3A).

Performance characteristics for *C. difficile* detection from FS compared to stool were calculated for the different testing procedures (PCR, GDH, toxin A/B, and TC) and are described in Table 1. In total, 24 *C. difficile* isolates recovered by TC (18 isolates matching in rectal swabs and in stool samples, 3 isolates recovered only from stool samples, and a further 3 isolates recovered only from rectal swabs) were successfully characterized by PCR-ribotyping. RT027 (5/24 [21%]) was the most prevalent ribotype,

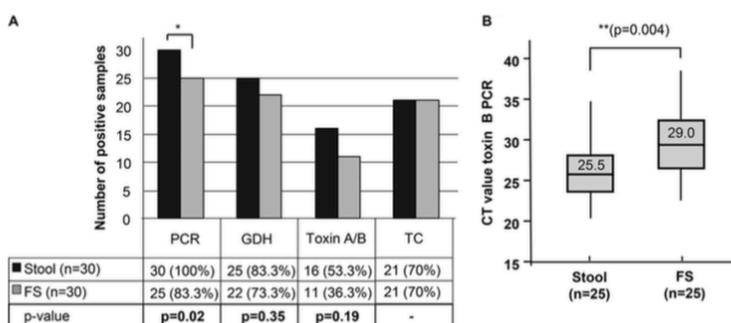


FIG 3 Detection of *C. difficile* by PCR, CDQCC, and TC in rectal swabs with liquid medium (FS) compared to stool samples. (A) Detection of *C. difficile* by PCR, C. Diff Quik Chek Complete (GDH and toxin A/B) (CDQCC), and by toxigenic culture (TC) in clinical stool samples and in FS. *, the detection rate of *C. difficile* by PCR was significantly lower when using FS ($P < 0.05$). (B) Comparison of the *Clostridium difficile* toxin B PCR cycle threshold (C_T) values of stool samples ($n = 25$) and FS ($n = 25$). The horizontal line in each box indicates the median, whereas the top and bottom lines represent the 75th and 25th percentiles, respectively. Patients with missing values were excluded ($n = 5$). **, a significant difference was found between the C_T values of stool samples and FS ($P = 0.004$).

followed by RT014/6 (3/24 [13%]). No correlation of ribotypes and diagnostic yield was found for any of the tests used.

Influence of storage of FS for up to 3 months on the detection rate of *C. difficile* by PCR, CDQCC, and TC. Storage of the FS at -80°C for up to 3 months had no significant impact on the detection rate of *C. difficile* in any of the tests used (Fig. 4).

DISCUSSION

This study was conducted to evaluate the use of Copan FecalSwabs, a rectal swab system with liquid Cary-Blair medium, for the laboratory diagnosis of CDI. Furthermore, the performance of nylon flocked dry swabs (no medium) for the detection of *C. difficile* by PCR and the impact of storage of rectal swabs at -80°C on the detection rate were evaluated.

We have shown that the use of FS is not a good alternative to the use of stool samples for the laboratory diagnosis of CDI, as the calculated sensitivities for the

TABLE 1 Performance of 30 rectal swabs with liquid medium in the detection of *Clostridium difficile* compared to performance of stool samples

Result of <i>C. difficile</i> detection in FS by assay ^a	Result of <i>C. difficile</i> detection in stool sample (no.)		Detection of <i>C. difficile</i> using FS compared with stool samples (% [95% CI]) ^b			
	Positive	Negative	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
GX			83.3 (64.5–93.7)		100 (83.4–100)	
Positive	25	0				
Negative	5	0				
Toxigenic culture			85.7 (62.6–96.2)	66.7 (30.9–91)	85.7 (62.6–96.2)	66.7 (30.9–91)
Positive	18	3				
Negative	3	6				
GDH (by CDQCC)			88 (67.7–96.8)	100 (46.3–100)	100 (81.5–100)	62.5 (25.9–89.8)
Positive	22	0				
Negative	3	5				
Toxin A/B (by CDQCC)			68.8 (41.5–87.9)	100 (73.2–100)	100 (67.9–100)	73.7 (48.6–89.9)
Positive	11	0				
Negative	5	14				

^aFS, rectal swab with liquid medium; GX, GeneXpert *C. difficile*/Epi test; CDQCC, C. Diff Quik Chek Complete.

^bCI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

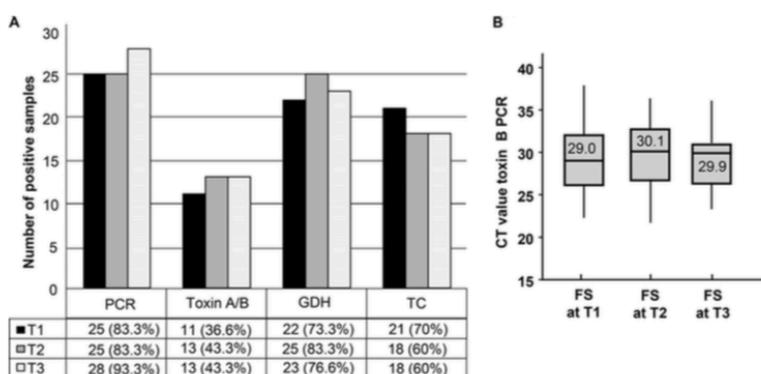


FIG 4 Detection of *C. difficile* by PCR, CDQCC, and TC in rectal swabs with liquid medium (FS) before and after storage at -80°C . (A) Detection of *C. difficile* by PCR, C. Diff Quik Chek Complete (GDH and toxin A/B), and by toxigenic culture (TC) in rectal swabs with FS ($n = 30$) immediately after swabbing (T1), after 1 month of storage (T2), and after 3 months of storage (T3). No significant difference was found before and after storage. (B) Comparison of the *Clostridium difficile* toxin B PCR cycle threshold (C_T) values of FS ($n = 25$) at T1, T2, and T3. The horizontal line in each box indicates the median, whereas the top and bottom lines represent the 75th and 25th percentiles, respectively. Patients with missing values were excluded ($n = 5$). No significant difference was found between the C_T values of FS before and after storage.

detection of *C. difficile* were unacceptably low for the detection of *C. difficile* and its toxins in rectal swabs compared to those with the use of stool samples.

For the detection of *C. difficile* by PCR (for example, in surveillance studies), the use of dry swabs is possible without any loss of sensitivity. In that respect, our results are in good accordance with those of other studies showing that PCR from rectal swabs is suitable for the detection of *C. difficile* (10, 13, 14). Storage of swabs (FS and dry swabs) at -80°C for up to 3 months did not have any impact on the detection rate of *C. difficile* by any testing procedure used in this study.

The idea of streamlining *C. difficile* diagnostics with user-friendly rectal swabs (instead of stool samples) is not new. McFarland et al. stated in 1987 for the first time that the use of rectal swabs with semisolid Amies transport medium for culturing *C. difficile* was comparable to the use of stool samples (15). Since then, the use of rectal (or perirectal) swabs for the detection of *C. difficile* in asymptomatic carriers by PCR and/or toxigenic culture has been shown to be helpful (6, 13). Thus, rectal swabs are commonly used for the detection of asymptomatic carriers in surveillance studies (4, 5). One small study with 22 symptomatic patients suspected of having CDI indicated that the use of rectal swabs might be applicable for the diagnosis of CDI (16). In that study, the detection of PCR was only done by real-time PCR. No systematic data exist on the utility of rectal swabs for the laboratory diagnosis of CDI in symptomatic patients using a two-step algorithm, as recommended by European ESCMID guidelines, including a sensitive screening test (PCR or GDH) and a more specific confirmation assay (*C. difficile* toxin A/B EIA) (1). Recently, FS were shown to enhance the recovery and viability of diarrheagenic bacteria (10). This swab system provides a flocced tip that, according to the manufacturer, dispenses the entire fecal sample into the liquid Cary-Blair medium. Thus, all tests required for the diagnosis of CDI can potentially be performed from the liquid medium of one swab.

In our study, however, the detection rate of *C. difficile* by PCR from the liquid Cary-Blair medium of FS was significantly lower than that from stool samples. Analysis of the toxin B gene C_T values confirmed this to be a result of diluting effects (small amount of fecal sample diluted in 2 ml of liquid medium). Although in our small study, the detection rates of *C. difficile* by CDQCC (GDH and toxin A/B detection) and by toxigenic culture were not significantly different between FS and stool, we would not recommend using FS for the diagnosis of CDI, as the diagnostic accuracy was not high

enough compared to that obtained by the use of stool samples (the sensitivity in our study being as low as 63.3% for toxin A/B testing from FS). Furthermore, it is rather likely that diluting effects also compromise the performance of GDH and toxin A/B EIA as well as of TC. Probably, we were just not able to reach statistical significance due to small sample size and the generally lower sensitivity of the mentioned testing procedures. On the other hand, FS is FDA cleared for transport and culture of gastrointestinal (GI) pathogens, but it is not FDA cleared for use with any molecular GI assays. Newer studies conclude that FS with Cary-Blair medium can be used for molecular detection of pathogens without cross-reaction or inhibitory effects (10, 17). Nevertheless, a cross-reaction of the Cary-Blair medium and the GeneXpert *C. difficile* test as an explanation for the lower detection rate seen in our study cannot completely be ruled out.

In contrast to the ESCMID guidelines, the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) guidelines recommend a single-step algorithm for the laboratory diagnosis of *C. difficile* based on PCR (18). Therefore, the use of dry swabs would be appropriate and can probably speed up and facilitate the diagnosis of CDI. Nevertheless, using single-step PCR-based detection of *C. difficile* may lead to overdiagnosis of CDI due to the high sensitivity but lower specificity of PCR (19). Thus, careful clinical evaluation of the patient to distinguish between an asymptomatic carrier, an excretor (i.e., a patient with other reasons for diarrhea), and a patient with true CDI is even more important when using only PCR for *C. difficile* detection.

Our data clearly show that the storage of FS and dry swabs at -80°C for up to 3 months had no impact on the detection rate of *C. difficile* by any of the methods used. This is in accordance with data from a recent publication investigating the cultural recovery of *C. difficile* from FS. Hirvonen and Kaukoranta showed that storage of FS at -70°C did not affect the cultural recovery rate of *C. difficile*, whereas storage of FS at 4°C or storage at room temperature was found to result in a significantly lower recovery rate of *C. difficile* (10).

Our study has several limitations. First, we simulated rectal swabbing using *C. difficile*-positive stool samples and did not collect rectal swabs from patients. Thus, our data should be confirmed in a prospective clinical study using both fecal swabs and stool samples in parallel. It was our aim to evaluate the practical potential of rectal swabs for the diagnosis of CDI in this study. Furthermore, we only included *C. difficile*-positive stool samples in our study. This might have influenced the sensitivity analysis in our study.

In conclusion, the use of FS is no alternative to the use of stool samples for the two-step laboratory diagnosis of CDI, as the sensitivities were lower for rectal swabs than for stool samples for all the assays used. For PCR-based single-step laboratory diagnosis of CDI, as well as for the simple detection of asymptomatic carriers in surveillance studies or for targeted surveillance in infection control interventions, the use of dry swabs is a suitable alternative to stool samples without any loss of sensitivity. Even if small studies on patients have already shown that PCR for the detection of *C. difficile* from rectal swabs is reliable (16), our data should be confirmed in a prospective clinical study on a larger scale using both fecal swabs and stool samples from patients in parallel. Storage of dry swabs and FS at -80°C for up to 3 months is possible without compromising the detection rate of *C. difficile*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially financed by Da Volterra, Paris, and by the Innovative Medicines Initiative Joint undertaking under grant agreement 115523, with financial contribution from the EU Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies in kind contribution.

The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

N.J. has received payment for lectures from MSD Sharp & Dohme and travel support from IMDx (Qiagen). H.S. reports research grants from Accelerate and personal fees

from 3M, Becton Dickinson, bioMérieux, and Thermo Fisher. M.J.G.T.V. has served at the speakers' bureaus of Pfizer, Merck/MSD, Organobalance, Gilead Sciences, and Astellas Pharma, received research funding from 3M, Astellas Pharma, Seres Therapeutics, Organobalance, and Gilead Sciences, and is a consultant to Berlin Chemie, Merck/MSD, and Maat Pharma. All other authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20(Suppl 2):S1–S26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>.
2. Scheurer D. 2008. Diagnostic and treatment delays in recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *J Hosp Med* 3:156–159. <https://doi.org/10.1002/jhm.277>.
3. Frenz MB, McIntyre AS. 2003. Reducing delays in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* diarrhoea. *QJM* 96:579–582. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcg098>.
4. Longtin Y, Paquet-Bolduc B, Gilca R, Garenc C, Fortin E, Longtin J, Trottier S, Gervais P, Roussy JF, Levesque S, Ben-David D, Cloutier I, Loo VG. 2016. Effect of detecting and isolating *Clostridium difficile* carriers at hospital admission on the incidence of *C. difficile* infections: a quasi-experimental controlled study. *JAMA Intern Med* 176:796–804. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.0177>.
5. Johnson S, Clabots CR, Linn FV, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. 1990. Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet* 336:97–100. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91605-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91605-A).
6. Rogers DS, Kundrapu S, Sunkesula VC, Donskey CJ. 2013. Comparison of perirectal versus rectal swabs for detection of asymptomatic carriers of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 51:3421–3422. <https://doi.org/10.1128/JCM.01418-13>.
7. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. 2008. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol* 46:1655–1658. <https://doi.org/10.1128/JCM.02047-07>.
8. Van Horn KG, Audette CD, Tucker KA, Sebeck D. 2008. Comparison of 3 swab transport systems for direct release and recovery of aerobic and anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:471–473. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.08.004>.
9. Nys S, Vijgen S, Magerman K, Cartuyvels R. 2010. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:453–456. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-0883-5>.
10. Hirvonen JJ, Kaukoranta SS. 2014. Comparison of FecalSwab and ESwab devices for storage and transportation of diarrheagenic bacteria. *J Clin Microbiol* 52:2334–2339. <https://doi.org/10.1128/JCM.00539-14>.
11. Fawley WN, Knetsch CW, MacCannell DR, Hamanus C, Du T, Mulvey MR, Paulick A, Anderson L, Kuijper EJ, Wilcox MH. 2015. Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *PLoS One* 10:e0118150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118150>.
12. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F, Kuijper EJ. 2008. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol* 57:1377–1382. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47714-0>.
13. Curry SR, Schlackman JL, Hamilton TM, Henderson TK, Brown NT, Marsh JW, Shutt KA, Brooks MM, Pasculle AW, Muto CA, Harrison LH. 2011. Perirectal swab surveillance for *Clostridium difficile* by use of selective broth preamplification and real-time PCR detection of *tcdB*. *J Clin Microbiol* 49:3788–3793. <https://doi.org/10.1128/JCM.00679-11>.
14. Kundrapu S, Sunkesula VC, Jury LA, Sethi AK, Donskey CJ. 2012. Utility of perirectal swab specimens for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 55:1527–1530. <https://doi.org/10.1093/cid/cis707>.
15. McFarland LV, Coyle MB, Kremer WH, Stamm WE. 1987. Rectal swab cultures for *Clostridium difficile* surveillance studies. *J Clin Microbiol* 25:2241–2242.
16. Shakir FA, Thompson D, Marlar R, Ali T. 2012. A novel use of rectal swab to test for *Clostridium difficile* infection by real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 107:1444–1445. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.162>.
17. Silbert S, Gostnell A, Kubasek C, Widen R. 2017. Evaluation of the new FecalSwab system for maintaining stability of stool samples submitted for molecular tests. *J Clin Microbiol* 55:1588–1590. <https://doi.org/10.1128/JCM.00273-17>.
18. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH, Society for Healthcare Epidemiology of America, Infectious Diseases Society of America. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:431–455. <https://doi.org/10.1086/651706>.
19. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, Nguyen HH, Huang B, Tang YW, Lee LW, Kim K, Taylor S, Romano PS, Panacek EA, Goodell PB, Solnick JV, Cohen SH. 2015. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in the molecular test era. *JAMA Intern Med* 175:1792–1801. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.4114>.